

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. August 2005 (04.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/071108 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/000751

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Januar 2005 (26.01.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 003 860.0 26. Januar 2004 (26.01.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GmbH** [DE/DE]; Löbstedter Strasse 103-105, 07749 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WAGNER, Gerd** [DE/DE]; Dornburgerstrasse 8, 07743 Jena (DE). **WIEHLMANN, Lutz** [DE/DE]; Günther-Wagner-Allee 9, 30177 Hannover (DE). **TUEMMLER, Burkhard** [DE/DE]; Eisenacher Weg 41, 30179 Hannover (DE).

(74) Anwalt: **HUENGES, Martin**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR GENO- AND PATHOTYPING PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GENO- UND PATHOTYPISIERUNG VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(57) Abstract: The invention relates to a method for geno- and *pathotyping Pseudomonas aeruginosa*-type bacteria by means of hybridisation assays on a biochip or an micro matrix. Specific oligonucleotide probes usable for a detection method and biochips provided therewith are also disclosed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mittels Hybridisierungsassays auf einem Biochip bzw. Microarray. Weiter betrifft die Erfindung spezifische Oligonukleotid-Sonden, die im Rahmen des Nachweisverfahrens eingesetzt werden können, sowie Biochips mit derartigen Oligonukleotid-Sonden.



WO 2005/071108 A2

Verfahren zur Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mittels Hybridisierungsassays auf einem Biochip bzw. einem Microarray. Weiter betrifft die Erfindung spezifische Oligonukleotid-Sonden, die im Rahmen des Nachweisverfahrens eingesetzt werden können, sowie Biochips mit derartigen Oligonukleotid-Sonden.

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitärer Umweltkeim, der als opportunistisches Pathogen eine hohe Morbidität und Mortalität bei Patienten verursacht, die ein lokal oder systemisch geschwächtes Immunsystem haben. Zusätzlich nimmt *Pseudomonas aeruginosa* durch die chronische Besiedlung der Atemwege von Mukoviszidose-Patienten einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Aufgrund der umfangreichen metabolischen und adaptiven Fähigkeiten von *Pseudomonas aeruginosa* ist die Behandlung einer Infektion oft sehr aufwändig und eine vollständige Elimination des Bakteriums oft nicht möglich.

Es wurde gezeigt, dass 70% der Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* auf Intensivstationen von Erregern verursacht wurden, die bereits vorher, zum Teil sogar mehrfach oder mit mehreren Wochen Abstand, bei anderen Patienten nachgewiesen wurden. Derartige nosokomiale Infektionen bedeuten, neben allen unmittelbaren Konsequenzen für die betroffenen Patienten, einen immensen Kostenaufwand für das Gesundheitssystem. Aufgrund dieser hohen Rate an Übertragungen innerhalb des Klinikumfeldes besteht somit ein Bedarf an der Überwachung auftretender Infektionen sowie an der Vermeidung der Ausbreitung und Persistenz von Erregern im Zuge einer Hygienekontrolle.

Für eine erfolgreiche Infektionsvermeidung ist das Erkennen der Infektionsquellen essentiell, wobei zusätzlich zum Erregernachweis oft zu klären ist, ob mehrfach isolierte Stämme der selben Spezies einem gemeinsamen Klon entstammen oder

- 2 -

unterschiedlichen Ursprungs sind. Diesbezügliche Untersuchungen werden unter dem Begriff "Erregertypisierung" zusammengefasst.

5 Eine verlässliche Typisierung von Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* ließ sich bislang nur mittels molekularbiologischer Methoden durchführen, die vergleichsweise kompliziert und teuer sind. So wurden bisher *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate mit Hilfe einer Wechselfeldgelelektrophorese typisiert und den verschiedenen Subgruppen zugeordnet. Dafür wurde die genomische DNA des jeweiligen Stammes mit Restriktionsenzymen geschnitten und aufgetrennt. Eine solche Untersuchung
10 setzt, neben dem Zeitaufwand von mehreren Wochen für jede Analyse, ein hohes Maß an Vorkenntnissen voraus und kann nur in wenigen Laboratorien durchgeführt werden.

Eine molekularbiologische Routine-Typisierung ist somit aufgrund der entstehenden
15 Kosten bislang nicht gerechtfertigt. Es besteht somit ein Bedarf an Nachweisverfahren für *Pseudomonas aeruginosa*, die auf kostengünstiger Weise von nicht spezialisierten molekularbiologischen Routinelabors durchgeführt werden können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum
20 spezifischen Nachweis und zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* bereitzustellen, das mit relativ geringem technischen Aufwand und kostengünstig durchgeführt werden kann. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Vorrichtung zum spezifischen Nachweis und zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterienstämmen der Spezies
25 *Pseudomonas aeruginosa* zur Verfügung zu stellen, die sich durch eine leichte Handhabbarkeit sowie durch eine Kompatibilität mit üblicherweise in molekularbiologischen Laboratorien verwendeten Geräten wie beispielsweise Tischzentrifugen und Pipetten auszeichnet.

- 3 -

Diese und weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen angegebenen Gegenstände gelöst.

5 Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen definiert.

Die Aufgaben werden erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass ein Biochip bzw. Nukleinsäure-Chip mit Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* bereitgestellt wird.

10

Der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip bietet den wesentlichen Vorteil, dass auf diese Weise *Pseudomonas aeruginosa* auf schnelle und einfache Weise in einem diagnostischen Routinelabor innerhalb eines Tages nachgewiesen werden kann.

Insbesondere ermöglicht der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip die Geno- und

15

Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*. Somit können auftretende Infektionen überwacht werden und bei Verdacht auf eine nosokomiale Ausbreitung dieses Erregers umgehend Vorkehrungen getroffen werden, um die Ausbreitung und Persistenz von *Pseudomonas aeruginosa* zu vermeiden.

20

Unter einem Nukleinsäure-Chip wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten Oligonukleotid-Sonden bezeichnet. Die vorbestimmten Bereiche auf dem Träger werden im Folgenden auch als Array-Elemente bezeichnet.

25

Die Verwendung eines Nukleinsäure-Chips zum spezifischen Nachweis der *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme ermöglicht die Detektion der Wechselwirkungsreaktion zwischen den in der zu untersuchenden Probe vorliegenden Target-Nukleinsäuren und Oligonukleotid-Sonden durch übliche

- 4 -

Verfahren wie beispielsweise durch Fluoreszenzdetektion oder radiochemische Methoden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Anwendung von Absorptionsmessungen erwiesen, da diese besonders kostengünstig durchzuführen sind. Eine derartige Absorptionsmessung kann durch Verwendung einer reaktiven
5 Färbemethode, die an den Oberflächenbereichen stattfindet, an denen eine Wechselwirkungsreaktion stattgefunden hat, wesentlich verbessert und verbilligt werden. Hier hat sich u.a. die Abscheidung von Silber an mit Goldnanokügelchen markierten Targetmolekülen bewährt (siehe DE 100 33 334.6 und WO 02/02810). Zum Nachweis der Silberabscheidung kann ein Gerät verwendet werden, das eine
10 oder mehrere Leuchtdioden beliebiger geeigneter Emissionswellenlänge als Lichtquelle verwendet und beispielsweise eine CCD-Kamera zur orts aufgelösten Detektion der Wechselwirkungsreaktion auf den vorbestimmten Bereichen des Chips aufweist.

15 Zur Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden u.a. folgende Definitionen verwendet:

Unter einem Mikroarray bzw. Microarray bzw. Sonden-Array wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Anordnung von molekularen Sonden bzw. einer
20 Substanzbibliothek auf einem Träger verstanden, wobei die Position einer jeden Sonde separat bestimmt ist. Vorzugsweise umfasst der Array definierte Stellen bzw. vorbestimmte Bereiche, so genannte Array-Elemente, die besonders bevorzugt in einem bestimmten Muster angeordnet sind, wobei jedes Array-Element üblicherweise nur eine Spezies an Sonden beinhaltet. Die Anordnung der Moleküle
25 bzw. Sonden auf dem Träger kann dabei durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erzeugt werden. Eine Position innerhalb der Anordnung, d.h. des Arrays, wird üblicherweise als Spot bezeichnet. Der Sonden-Array bildet somit die Detektionsfläche.

- 5 -

Unter einem Array-Element bzw. einem vorbestimmten Bereich bzw. einem Spot wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein für die Deposition einer molekularen Sonde bestimmtes Areal bzw. nach der Deposition mit einer oder mehreren definierten molekularen Sonden belegtes Areal auf einer Oberfläche verstanden, die Summe aller belegten Array-Elemente ist das Sonden-Array bzw. Microarray.

Unter einer Sonde bzw. Oligonukleotid-Sonde wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Molekül verstanden, das zum Nachweis anderer Moleküle durch ein bestimmtes, charakteristisches Bindungsverhalten bzw. eine bestimmte Reaktivität verwendet wird. Für die auf dem Array angeordneten Sonden kommt jede Art von Nukleinsäuren und/oder deren Analoga in Frage, die sich an feste Oberflächen koppeln lassen und eine spezifische Affinität aufweisen. Die Oligonukleotide können DNA-Moleküle, RNA-Moleküle und/oder deren Analoga wie z.B. artifizielle bzw. modifizierte Nukleotide umfassen. Beispielsweise kann es sich bei den Oligonukleotid-Sonden um Oligonukleotide mit einer Länge von 10 bis 100 Basen, vorzugsweise 15 bis 50 Basen und besonders bevorzugt von 20 bis 30 Basen Länge handeln, die auf der Array-Oberfläche immobilisiert sind.

Typischerweise handelt es sich erfindungsgemäß bei den Oligonukleotid-Sonden um einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle oder Moleküle von Nukleinsäureanaloga, bevorzugt einzelsträngige DNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, die mindestens über einen Sequenzbereich verfügen, der zu einem Sequenzbereich der Target-Nukleinsäuren komplementär ist. Je nach Nachweisverfahren und Anwendung können die Oligonukleotid-Sonden auf einem festen Trägersubstrat z.B. in Form eines Microarrays immobilisiert sein. Darüber hinaus können sie je nach

- 6 -

Nachweisverfahren radioaktiv oder nicht radioaktiv markiert sein, so dass sie über eine im Stand der Technik übliche Nachweisreaktion nachgewiesen werden können.

Unter einem Target bzw. einer Target-Nukleinsäure wird im Rahmen der
5 vorliegenden Erfindung insbesondere eine im Genom von *Pseudomonas aeruginosa*
vorliegende Nukleinsäure verstanden, die Hinweise auf die Identität eines in der
Probe vorliegenden Stamms der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, von
krankheitsassoziierten Genen und/oder auf die Identität des vorliegenden Flagellen-
Typs liefert. Die Target-Nukleinsäuren umfassen in der Regel Sequenzen mit einer
10 Länge von 40 bis 10.000 Basen, bevorzugt von 60 bis 2.000 Basen, ebenfalls
bevorzugt von 60 bis 1.000 Basen, insbesondere bevorzugt von 60 bis 500 Basen und
am meisten bevorzugt von 60 bis 150 Basen. Ihre Sequenz beinhaltet ggf. die
Sequenzen von Primern sowie die durch die Primer definierten Sequenzbereiche des
Templates. Bei den Target-Nukleinsäuren kann es sich insbesondere um einzel- oder
15 doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle handeln, von denen ein oder beide Stränge
nach einer erfolgten geeigneten Behandlung, wie sie z.B. im Stand der Technik
beschrieben ist, markiert sind, so dass sie in einem der im Stand der Technik
üblichen Nachweisverfahren nachgewiesen werden können. Besonders bevorzugt
handelt es sich bei Target-Nukleinsäuren um Nukleinsäuren, die in mindestens 30%
20 der Population von *Pseudomonas aeruginosa* eine Basensubstitution verglichen mit
der Sequenz des Genoms des Referenzstamms PAO1 (siehe
www.pseudomonas.com) von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen; um
Nukleinsäuren, die in nicht in allen Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*
vorkommen; um Nukleinsäuren, die in Pathogenitätsinseln im Genom von
25 *Pseudomonas aeruginosa* vorliegen; um Nukleinsäuren, die in krankheitsassoziierten
Genen wie *exoS* und *exoU* vorliegen; sowie um Nukleinsäuren, die in für Flagellen
von *Pseudomonas aeruginosa* kodierenden Genen enthalten sind.

- 7 -

Als Target-Sequenz wird erfindungsgemäß der Sequenzbereich des Targets bezeichnet, der durch Hybridisierung mit der Sonde nachgewiesen wird. Erfindungsgemäß wird auch davon gesprochen, dass dieser Bereich durch die Sonde adressiert wird.

5

- Unter einer Substanzbibliothek wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Vielzahl von unterschiedlichen Sondenmolekülen verstanden, vorzugsweise mindestens 2 bis 1.000.000 unterschiedliche Moleküle, besonders bevorzugt mindestens 10 bis 10.000 unterschiedliche Moleküle und am meisten bevorzugt zwischen 50 und 1.000 unterschiedlichen Molekülen. Bei speziellen Ausgestaltungen kann eine Substanzbibliothek auch nur mindestens 50 oder weniger oder mindestens 30.000 unterschiedliche Moleküle umfassen. Die Substanzbibliothek ist vorzugsweise als Array auf einem Träger in der Reaktionskammer der erfindungsgemäßen Vorrichtung angeordnet. Die Anordnung der Substanzen bzw. Sondenmoleküle auf dem Träger erfolgt bevorzugt derart, dass jeder Substanz bzw. jeder Spezies von Sondenmolekülen ein bestimmter, eindeutig zu identifizierender Ort zugeordnet ist und dass jede Substanz bzw. jede Spezies von Sondenmolekülen getrennt von den anderen immobilisiert ist.
- 20 Unter einem Trägerelement bzw. Träger bzw. Substanzbibliothekenträger wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Festkörper verstanden, auf dem das Sonden-Array aufgebaut ist. Bei dem Träger, der üblicherweise auch als Substrat oder Matrix bezeichnet wird, kann es sich z.B. um Objektträger oder Wafer oder aber auch keramische Materialien handeln. Die Gesamtheit aus in Array-Anordnung auf der Detektionsfläche abgelegten Molekülen bzw. der in Array-Anordnung auf der
- 25 Detektionsfläche abgelegten Substanzbibliothek und dem Träger wird häufig auch als "Nukleinsäure-Chip", "Chip", "Biochip", "Mikroarray", "Microarray", "DNA-Chip", "Sondenarray" etc. bezeichnet.

Herkömmliche Nukleinsäure-Chips bzw. Arrays bzw. Microarrays im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen etwa 10 bis 5.000, vorzugsweise 20 bis 500 und besonders bevorzugt 50 bis 100 unterschiedliche Spezies von Oligonukleotid-Sonden auf einer, vorzugsweise quadratischen, Fläche von z.B. 1 mm bis 4 mm x 1 mm bis 4 mm, vorzugsweise von 2 mm x 2 mm oder etwa 17,64 mm². In weiteren Ausgestaltungen umfassen Mikroarrays im Rahmen der vorliegenden Erfindung etwa 50 bis etwa 80.000, vorzugsweise etwa 100 bis etwa 65.000, besonders bevorzugt etwa 1.000 bis etwa 10.000 unterschiedliche Spezies von Sondenmolekülen auf einer Fläche von mehreren mm² bis mehreren cm², vorzugsweise etwa 1 mm² bis 10 cm², besonders bevorzugt etwa 2 mm² bis etwa 1 cm² und am meisten bevorzugt etwa 4 mm² bis etwa 6,25 mm². Beispielsweise weist ein herkömmliches Mikroarray von 100 bis 65.000 unterschiedliche Spezies von Sondenmolekülen auf einer Fläche von etwa 2,4 mm x etwa 2,4 mm auf. Weitere beispielhafte Größen der Flächen des Mikroarrays bzw. der Flächen für die Synthese der Biopolymere sind etwa 1 bis 10 mm x etwa 1 bis 10 mm, vorzugsweise etwa 2,4 bis 5 mm x etwa 2,4 bis 5 mm und besonders bevorzugt etwa 3,5 bis 4,5 mm x etwa 3,5 x 4,5 mm.

Eine Markierung bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine detektierbare Einheit, beispielsweise ein Fluorophor oder eine Ankergruppe, an die eine detektierbare Einheit oder ein die Umsetzung eines löslichen Edukts bzw. Substrats in ein unlösliches Produkt katalysierender Katalysator oder Kristallisationskeim gekoppelt werden kann.

Unter einem Edukt bzw. Substrat (im Sinne eines enzymatischen Substrats) wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein im Reaktionsmedium gelöst vorliegendes Molekül bzw. eine Kombination von Molekülen verstanden, das bzw. die mit Hilfe eines Katalysators bzw. eines Kristallisationskeimes und/oder eines umsetzenden

- 9 -

Agens lokal abgeschieden wird. Das umsetzende Agens kann beispielsweise ein reduzierendes Agens wie bei der Silberabscheidung oder ein oxidierendes Agens wie bei der Erzeugung eines Farbstoffs durch enzymatische Oxidation sein.

- 5 Als Probe bzw. Probenlösung bzw. Analyt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die zu analysierende Flüssigkeit mit den nachzuweisenden und ggf. zu amplifizierenden Targetmolekülen bezeichnet.

- Eine Vervielfältigungsreaktion bzw. eine Amplifikationsreaktion umfasst im
10 Rahmen der vorliegenden Erfindung üblicherweise 10 bis 50 oder mehr Amplifikationszyklen, vorzugsweise etwa 25 bis 45 Zyklen, besonders bevorzugt etwa 40 Zyklen. Eine zyklische Amplifikationsreaktion ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).

- 15 Als Primer wird üblicherweise ein kurzes DNA- oder RNA-Oligonukleotid mit etwa 12 bis 30 Basen bezeichnet, das komplementär zu einem Abschnitt eines größeren DNA- oder RNA-Moleküls ist und über eine freie 3'-OH-Gruppe an seinem 3'-Ende verfügt. Aufgrund dieser freien 3'-OH-Gruppe kann der Primer als Substrat für
20 beliebige DNA- oder RNA-Polymerasen dienen, die in 5'-3'-Richtung Nukleotide an den Primer synthetisieren. Die Sequenz der neu synthetisierten Nukleotide ist dabei durch die Sequenz des mit dem Primer hybridisierten Templates vorgegeben, die jenseits der freien 3'-OH-Gruppe des Primers liegt. Primer üblicher Länge umfassen zwischen 12 bis 50 Nukleotide, bevorzugt zwischen 15 und 30 Nukleotide.

- 25 Als Template oder Template-Strang wird üblicherweise ein doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül oder ein Nukleinsäurestrang bezeichnet, der als Vorlage zur Synthese von komplementären Nukleinsäuresträngen dient.

- 10 -

Als Hybridisierung wird die Bildung von doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen oder Duplexmolekülen aus komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen bezeichnet. Dabei findet die Assoziation vorzugsweise
5 immer zu Paaren von A und T bzw. G und C statt. Eine Assoziation kann vorzugsweise auch über nicht klassische Basenpaarungen wie Wobbelbasenpaarungen z.B. zwischen Inosin und G bzw. Inosin und C erfolgen. Im Rahmen einer Hybridisierung können z.B. DNA-DNA-Duplexes, DNA-RNA- oder RNA-RNA-Duplexes gebildet werden. Durch eine Hybridisierung können auch
10 Duplexes mit Nukleinsäureanaloga gebildet werden, wie z.B. DNA-PNA-Duplexes, RNA-PNA-Duplexes, DNA-LNA-Duplexes und RNA-LNA-Duplexes. Hybridisierungsexperimente werden üblicherweise benutzt, um die Sequenzkomplementarität und damit die Identität zwischen zwei verschiedenen Nukleinsäuremolekülen nachzuweisen.
15

Dabei bedeutet "spezifische Hybridisierung" das unter den hier beschriebenen oder dem Durchschnittsfachmann im Zusammenhang mit *in situ*- und *in-vitro*-Hybridisierungstechniken bekannten stringenten Hybridisierungsbedingungen die Target-Nukleinsäuren stärker an die Sonde binden als die Nicht-Target-
20 Nukleinsäuren und vorzugsweise im wesentlichen nur die Target-Nukleinsäuren, nicht aber Nicht-Target-Nukleinsäuren an die Sonde binden.

Bei einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird somit eine Microarray-Vorrichtung, umfassend ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen
25 immobilisierten Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, bereitgestellt. Die Gesamtheit aus in vorbestimmten Bereichen bzw. in Array-Anordnung auf der Detektionsfläche abgelegten Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der

- 11 -

Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und dem Träger wird im folgenden auch als "Nukleinsäure-Chip", "Chip", "Biochip", "Microarray", "Sondenarray" etc. bezeichnet.

- 5 Als Nukleinsäure-Chips können im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere Chips eingesetzt werden, wie sie von den Firmen Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, USA) und Clondiag (Jena, Deutschland) vertrieben werden. Beispielsweise werden erfindungsgemäß Nukleinsäurechips eingesetzt, die in Microarray-Vorrichtungen implementiert sind, wie sie in den internationalen
- 10 Patentanmeldungen WO 01/02094 und WO 03/031063 beschrieben sind. Auf die in diesen Dokumenten enthaltene Offenbarung bezüglich der Anordnung des Chips in einer Vorrichtung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

- Besonders bevorzugt werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Vorrichtungen
- 15 mit Nukleinsäure-Chips eingesetzt, wie sie in der internationalen Patentanmeldung WO 03/059516 beschrieben sind. Auf die in diesem Dokument enthaltene Offenbarung bezüglich einer Vorrichtung zur Durchführung von Array-Verfahren wird hiermit ebenfalls ausdrücklich Bezug genommen.

- 20 Insbesondere wird somit als Vorrichtung zum Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ein, z.B. in WO 03/059516 beschriebenes, Reaktionsgefäß eingesetzt, welches eine für ein Laborreaktionsgefäß typische Form und/oder typische Größe aufweist, und bei dem auf einer seiner Grundflächen ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten
- 25 Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* angeordnet ist.

Unter Laborreaktionsgefäßen mit einer typischen Form und Größe werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Reaktionsgefäße verstanden, die als Einweg-Reaktionsgefäße, in der Standardausführung 1,5 ml fassend, in, insbesondere biologischen bzw. molekularbiologischen, Laboratorien üblicherweise verwendet werden. Derartige Laborreaktionsgefäße werden auch als Tubes und, nach dem bedeutendsten Hersteller, insbesondere als Eppendorf-Tubes oder "Eppis" (Hamburg, Deutschland) bezeichnet. So werden Laborreaktionsgefäße mit einer typischen Form und Größe von Eppendorf als Standard-Reaktionsgefäße oder Safe-Lock-Reaktionsgefäße angeboten. Selbstverständlich können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Reaktionsgefäße von Herstellern wie Greiner (Frickenhäusen, Deutschland), Millipore (Eschborn, Deutschland), Heraeus (Hanau, Deutschland) und BIOplastics (Landgraaf, Niederlande) sowie anderen Herstellern eingesetzt werden, die eine Form und Größe aufweisen, wie sie für Laborreaktionsgefäße insbesondere von Eppendorf typisch ist. Beispiele für Laborreaktionsgefäße mit einer typischen Form und Größe sind in Abbildung 16 gezeigt.

Unter Laborreaktionsgefäßen typischer Form und Größe werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere nicht Rundkolben oder andere Kolben wie Erlenmeyerkolben, Bechergläser oder Messzylinder verstanden.

Ein Reaktionsgefäß im Rahmen der vorliegenden Erfindung unterscheidet sich von den vorstehenden genannten Reaktionsgefäßen dadurch, dass auf einer seiner Grundflächen ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten Sondenmolekülen angeordnet ist. Trotz der Modifizierung eines herkömmlichen Laborreaktionsgefäßes durch Einbau eines derartigen Chips weist das Reaktionsgefäß eine für ein Laborreaktionsgefäß typische Form und/oder Größe auf. Das Reaktionsgefäß weist somit eine rotationssymmetrische Form, insbesondere eine zylindrische bzw. im Wesentlichen zylindrische Form auf. Von den für

- 13 -

herkömmliche Laborreaktionsgefäße typischen Formen und damit für das erfindungsgemäße Reaktionsgefäß denkbaren Formen ist ferner eine von der zylindrischen Grundform abweichende konische Form umfasst, wobei die Verjüngung vorzugsweise in Richtung der Affinitätsmatrix auftritt. Typische Formen sind ferner Kombinationen von zylindrischen bzw. im Wesentlichen zylindrischen Bereichen und konischen Bereichen (siehe u.a. Abbildungen 1-4 und 21 in WO 03/059516). Aufgrund der für Laborreaktionsgefäße typischen Form und Größe ist das Reaktionsgefäß mit dem darin eingebrachten Chip insbesondere mit üblichen Tischzentrifugen wie beispielsweise von Herstellern wie Eppendorf oder Heraeus kompatibel, d.h. das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip ist zur Zentrifugation in üblichen Tischzentrifugen geeignet. Übliche maximale Außendurchmesser für Standard-Laborreaktionsgefäße und damit auch für das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip liegen im Bereich von 0,8 cm bis 2 cm, vorzugsweise 1,0 cm bis 1,5 cm und besonders bevorzugt 1,1 cm bis 1,3 cm. Weitere bevorzugte Außendurchmesser sind bis 0,9 cm, bis 1,2 cm, bis 1,4 cm, bis 1,6 cm und bis 1,7 cm. Die Höhe des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes beträgt üblicherweise 1,5 cm bis 5,0 cm, vorzugsweise 2,0 cm bis 4,0 cm, besonders bevorzugt 2,5 cm bis 3,5 cm, und am meisten bevorzugt 2,8 cm bis 3,2 cm. Weitere bevorzugte Höhen sind bis 2,6 cm, bis 2,7 cm, bis 2,9 cm, bis 3,0 cm, bis 3,1 cm, bis 3,3 cm und bis 3,4 cm. In speziellen Ausgestaltungen kann die Höhe auch 1,0 cm oder mehr betragen.

Das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip ist in üblichen Tischzentrifugen zentrifugierbar und kann somit beispielsweise in herkömmlichen Tischzentrifugen wie einer Standard-Tischzentrifuge mit Standard-Rotor von Eppendorf sowie auch in üblichen Racks und Haltern für Reaktionsgefäße wie beispielsweise einem Tube-Rack von Eppendorf eingesetzt werden. Zum Einbringen der zu untersuchenden Probe sowie anderer zur Durchführung der Nachweisreaktion erforderlicher Reagenzien in das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip können übliche Pipetten

oder Spritzen wie beispielsweise variable und Fixvolumen-Pipetten von Eppendorf verwendet werden.

Das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip weist eine für ein Laborreaktionsgefäß
5 typische Größe auf. Typische Füllvolumina liegen im Bereich von 100 µl bis 2,5 ml, können aber bei speziellen Ausgestaltungen auch höher oder niedriger sein. Besonders bevorzugt hat das Reaktionsgefäß ein für ein Standard-Eppendorf-Tube übliches Füllvolumen von bis zu 1,5 ml. Weitere bevorzugte Füllvolumina sind bis 0,25 ml, bis 0,4 ml, bis 0,5 ml, bis 0,7 ml, bis 1,0 ml oder bis 2,0 ml.

10

Bei einer speziellen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird ein Nukleinsäure-Chip eingesetzt, bei dem ein Glas-Träger mit den darauf immobilisierten Oligonukleotiden direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, wie es in der internationalen Patentanmeldung WO 03/059516 beschrieben ist, eingebunden ist.
15 Derartige Reaktionsgefäße mit Nukleinsäure-Chips werden von der Firma Clondiaag beispielsweise als ArrayTube® vertrieben.

Wie bereits vorstehend erwähnt, kann es sich bei der Nukleinsäuresonde im Sinne der vorliegenden Erfindung um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der
20 Regel zwischen 12 und 100 Nukleotide umfassen wird, bevorzugt zwischen 15 und 50 und besonders bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide. Komplementarität sollte vorzugsweise bei einer Sonde von 15 bis 25 Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein.

25 Die Auswahl der Nukleinsäuresonden geschieht insbesondere unter dem Gesichtspunkt, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegt.

- 15 -

Durch eine wie z.B. im Folgenden beschrieben ausgewählte, definierte Sequenz werden vorzugsweise mindestens 20% oder mindestens 25% und besonders bevorzugt mindestens 30% oder mindestens 35% und am meisten bevorzugt mindestens 45% oder mindestens 50% der Population von Stämmen von

5 *Pseudomonas aeruginosa* erfasst. Derartige ausgewählte bzw. definierte Sondensequenzen liefern zwar nicht ein für einen einzigen Stamm charakteristisches Signal. Durch eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies von derartig definierten Sonden auf der Chip-Oberfläche wird jedoch ein Signalmuster bereitgestellt, das bei geeigneter Anzahl, z.B. etwa 50 oder etwa 70, verschiedener Sondensequenzen für

10 jeden Stamm charakteristisch ist.

Sonden, die eine Auswahl von mehr als 70% der Population von Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* erfassen, sind allerdings weniger bevorzugt, da die Diskriminierung einzelner Stämme durch diese Sonden zu gering sein könnte.

15

Sonden, die eine Auswahl von weniger als 20% der Population von *Pseudomonas aeruginosa* erfassen, sind ebenfalls weniger bevorzugt, da diese zwar eine hohe Selektivität aufweisen, aber nur für wenige Stämmen ein Signal liefern und somit für den überwiegenden Teil von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen nicht zur

20 Information beitragen.

Insbesondere sind die Oligonukleotid-Sonden des erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Chips spezifisch für Nukleinsäuren, die eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz des Referenzstamms von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen. Als

25 Referenzstamm wird die Sequenz des Genoms des Stamms PAO1 herangezogen, die unter <http://www.pseudomonas.com> zugänglich ist. Vorzugsweise sind die Oligonukleotid-Sonden spezifisch für Nukleinsäuren, die eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz von konservierten Genen des Referenzstamms PAO1

- 16 -

von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen. Ferner ist es bevorzugt, dass die Basensubstitution in mindestens 20%, mindestens 25%, mindestens 30%, mindestens 35%, mindestens 40% und besonders bevorzugt mindestens 50% einer Population von *Pseudomonas aeruginosa* auftritt. Das heißt, zur Typisierung werden

5 erfindungsgemäß insbesondere Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) aus konservierten *Pseudomonas aeruginosa*-Genen ausgewählt, die z.B. in mindestens 30% und besonders bevorzugt mindestens 50% der Population eine Basensubstitution aufweisen. Auf diese Weise können Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Nachweisgenauigkeit von mehr als 99,7% bestimmt bzw.

10 identifiziert werden.

Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip, insbesondere zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Sonden, Oligonukleotid-Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, nicht in allen

15 Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und vorzugsweise in mindestens 30% oder mindestens 50% der Population vorkommen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip Oligonukleotid-Sonden, die spezifisch für Nukleinsäuren sind,

20 die in Pathogenitätsinseln im Genom von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegen. Pathogenitätsinseln stellen distinkte DNA-Bereiche in Genom pathogener Bakterien dar, die sich vom restlichen Genom durch die Präsenz mehrerer Pathogenitätsassoziiierter Gene und durch eine Reihe weiterer struktureller Besonderheiten unterscheiden. Insbesondere weisen verschiedene *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme

25 eine bemerkenswerte genomische Diversität auf, die im Wesentlichen durch die Insertion oder Deletion von mobilen DNA-Einheiten wie (Pro)phagen, Plasmiden oder anderen Elementen verursacht wird. Derartige Pathogenitätsinseln liefern somit

ebenfalls wertvolle Informationen für die Diskriminierung von unterschiedlichen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa*.

Bei einer weiteren Ausführungsform umfassen der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip, insbesondere zusätzlich zu den für die Diskriminierung unterschiedlicher *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme geeigneten Sonden, Oligonukleotid-Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, die in krankheitsassoziierten Genen wie *exoS* und *exoU* vorliegen. Das Wissen über das Vorliegen bestimmter krankheitsassoziiierter Gene lässt Aussagen über die Prognose des erkrankten Patienten zu und erleichtert somit die weitere Behandlung.

Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip Oligonukleotid-Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, die in für Flagellen von *Pseudomonas aeruginosa* kodierenden Genen enthalten sind. Für *Pseudomonas aeruginosa* liegen zwei verschiedene Typen von Flagellen vor. Die Information über den Flagellentyp des detektierten *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm kann dem Arzt einen Hinweis für entsprechend einzusetzende Impfstoffe geben.

Bei Verwendung eines Nukleinsäure-Chips, der sämtliche Kategorien der vorstehend beschriebenen Oligonukleotid-Sonden umfasst, d.h. Sonden, die für SNP's spezifisch sind; Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, die nicht in allen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegen; Sonden, die für Nukleinsäuren in Pathogenitätsinseln spezifisch sind; Sonden, die für krankheitsassoziierte Gene spezifisch sind; und Sonden, die für Flagellen-kodierende Gene spezifisch sind, erhöhen die Genauigkeit bei der Bestimmung von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme auf mehr als 99,9%.

- 18 -

Insbesondere haben die Oligonukleotid-Sondenmoleküle die nachstehend angegebenen Längen von Sequenzen (alle Nukleinsäuremoleküle sind in 5'-3'-Richtung notiert). Die erfindungsgemäßen Oligonukleotid-Sondenmoleküle sind zum spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und insbesondere zur Geno- und Pathotypisierung der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* geeignet und werden dementsprechend insbesondere in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren eingesetzt. Des Weiteren sind die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotid-Sonden aber auch für den Einsatz in beliebigen anderen dem Fachmann bekannten Verfahren zum Nachweis bzw. der Markierung von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* geeignet.

Im Folgenden werden die Oligonukleotide bzw. Nukleinsäure-Sondenmoleküle aufgeführt, die bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen für die Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* geeignet sind:

15
GCGGAAAACCTTCCTGCACATGATGTT
GCGGAAAACCTTCCTCCACATGATGTT
AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG
AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
20 AAGAGGACGGCCGCCGGGTGACGCC
AAGAGGACGGCCGCCAGGTGACGCCG
GACAAGATGCGCCTCGACGACC
GACAAGATGCGTCTCGACGACCG
AGCCGACCTACGCGCCGGGCAG
25 CAGCCGACCTATGCGCCGGGCAG
CCGTTCGAACGGCTCATGGAGCA
GCCGTTCGAACGACTCATGGAGCA
TGGAGCAGCAAGTGTTCCCGGC

- 19 -

TGGAGCAGCAACTGTTCCCGGC
GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG
AACAAGACCGGCTCCACCAACGG
GCGACCTGGGCCTGGTGATCCT
5 GCGACCTGGGACTGGTGATCCT
GCCGACCAACTGAACTCCAACCTCG
GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA
CAGCCTGCGGTCATGTCCTCGG
CGCCAGTTTGAGAACGGAGTCACC
10 GCGCGATCTTCTCCACTTCATCGG
GCCTCCGCGATTGAACATCGTGAT
GTAGCCGGAGTCGAGCGGAATCAT
GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT
CGAGGAGTTTCGGACCCGCTTTGA
15 AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT
GCGCCTTCTCCTCTTTGCAGATGT
CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC
GCATCATTGCGCGTCACATCTGGT
TCTGAACTGCGGCTATCACCTGGA
20 AATTGATGGCTTCTCAGGCGCAGG
AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT
TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG
TGGTAGCTCTCGACGTACTGGCTG
CCCGTTGCTCATAACCCGTTCTG
25 AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG
ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT
AGCGTCCCTGACCAACCTCATCAG
CGCCAACAATTCGCCATTACAGCG

- 20 -

TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG
CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC
AGCCCAGCAATTGCGTGTTTCTCCG
AGCCCAGCAACTGCGTGTTTCTCC
5 GCTGCTGGCGGCGGTGTGC
TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT
CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG
GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
ACGGCCGCCGGGTGACGCC
10 ACGGCCGCCAGGTGACGCCG
GCCGACCTACGCGCCGGGC
AGCCGACCTATGCGCCGGGCA
GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA
GTTCGAACGACTCATGGAGCAGCAAG
15 CAGCCCAGTCAGGACGCGCA
AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC
GTGTCACGGCCCATGTCTAGCAGC
CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC
CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG
20 CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG
CCTGGACCTCTCCAAGGTTGCCT
GCCATTCCGACGACCAAACAAGGC

Daneben ist auch der Einsatz von Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend
25 beschriebenen Abwandlungen im Rahmen der vorliegenden Erfindung denkbar, die
für die folgenden Nukleinsäuren spezifisch sind:

GTCTCCCTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTCGGTTGCGTAGCCGAC

- 21 -

ATGTTGTATTTTCTTGCGGTATGAAGATGGGTGGTTGGGTCGGATATAG
GTACTTCTCTCTATTTTCTTTAATTGCTCTTATCTATGG

5 GACCTCGACCCCCGAGGGCTTCATGGCGTGTCGCGAACTCGCATGGCAAC
AGGC

TGGTCAGCCGAGTAACCGGCAGTTGTCGCCAGGTCTGGAGAATCCCGCC
ATTAGCTTGATTGACGGAAGTATAGCGACTTTGGTCCAACTCTGGCCCA
10 G

ATGGGCAAGAGAGTGGTTGTATTGCTATGGCTGCTATTCACATCAATGTC
AGCCCACGCCATCGATAAAAAAGTCAA

15 CGGCTCGGACATGGCCAATTGGGTCAGCAAGCAACGCGCCGGAGGCATG
CCTGGGTTCGCCAGGGGCGGTGCC

GTTCTGGAACGAGGGTGATGGCTGGGAATACGTGGAGGCGCCACAGCC
G
20

ATGTTTCGTACATGACAAGCGACTGCAGTACACCGTCAGGGTTCGC

Die folgenden Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend beschriebene
Abwandlungen sind vor allem zum spezifischen Nachweis von SNPs in
25 konservierten Genen von *Pseudomonas aeruginosa* geeignet:

oriC T-C_wt	GAAGCCCAGCAATTGCGTGTTTC
oriC T-C_mut_1	GAAGCCCAGCAACTGCGTGTTTC

- 22 -

	oriC T-C_wt_1	AGCCCAGCAATTGCGTGTTTCTCCG
	oriC T-C_mut_2	AGCCCAGCAACTGCGTGTTTCTCC
	oprL T-C_wt_1	GGTGCTGCAGGGTGTTTCGCCGG
	oprL T-C_mut_1	GGTGCTGCAGGGCGTTTCGCCGG
5	fliC a A-T_wt_1	CAAGATCGCCGCAGCGGTCAAC
	fliC a A-T_mut_1	CAAGATCGCCGCTGCGGTCAAC
	alkB2 G-A_wt_2	GCTGCTGGCGGCGGTGTGC
	alkB2 G-A_mut_2	TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT
	alkB2 A-G_wt_1	CCTCGCCCTGTTCCACCGCTCTGG
10	alkB2 A-G_mut_1	CTCGCCCTGTTCCCGCCGCTCTGG
	citS A-G_wt_1	TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG
	citS A-G_mut_1	CGAGCAACTGGCGGAGAAATCCG
	citS G-C_wt_1	GCGGAAAACCTCCTGCACATGATGTT
	citS G-C_mut_1	GCGGAAAACCTCCTCCACATGATGTT
15	oprI T-C_wt_1	AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG
	oprI T-C_mut_1	AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
	oprI T-C_wt_2	CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG
	oprI T-C_mut_2	GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
	ampC_1 G-A_wt_2	ACGGCCGCCGGGTGACGCC
20	ampC_1 G-A_mut_2	ACGGCCGCCAGGTGACGCCG
	ampC_2 C-T_wt	GACAAGATGCGCCTCGACGACC
	ampC_2 C-T_mut_1	GACAAGATGCGTCTCGACGACCG
	ampC_3 C-T_wt	AGCCGACCTACGCGCCGGGCAG
	ampC_3 C-T_mut_1	CAGCCGACCTATGCGCCGGGCAG
25	ampC_3 C-T_wt_1	GCCGACCTACGCGCCGGGC
	ampC_3 C-T_mut_2	AGCCGACCTATGCGCCGGGCA
	ampC_4 G-A_wt_2	GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA
	ampC_4 G-A_mut_2	GTTCGAACGACTCATGGAGCAGCAAG

- 23 -

	ampC_5 G-C_wt_1	TGGAGCAGCAAGTGTTCCCGGC
	ampC_5 G-C_mut_1	TGGAGCAGCAACTGTTCCCGGC
	ampC_6 T-C_wt	GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG
	ampC_6 T-C_mut_1	AACAAGACCGGCTCCACCAACGG
5	ampC_7 C-A_wt	GCGACCTGGGCCTGGTGATCCT
	ampC_7 C-A_mut_1	GCGACCTGGGACTGGTGATCCT
	oprL T-C_wt_2	GTGCTGCAGGGTGTTTCGCCG
	oprL T-C_mut_2	GCTGCAGGGCGTTTCGCCG
	oprI T-C_wt_3	GCTCAGCAGACTGCTGACGAGGCTAACG
10	oprI T-C_mut_3	GCTCAGCAGACCGCTGACGAGGCTAAC
	ampC_3 C-T_wt_2	CGACCTACGCGCCGGGCAG
	ampC_3 C-T_mut_3	CGACCTATGCGCCGGGCAGC
	ampC_4 G-A_wt_3	CGTTCGAACGGCTCATGGAGCAG
	ampC_4 G-A_mut_3	CGTTCGAACGACTCATGGAGCAGC
15	ampC_7 C-A_wt_1	CGACCTGGGCCTGGTGATCCT
	ampC_7 C-A_mut_2	GCGACCTGGGACTGGTGATCCTGG

Die folgenden Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zum Nachweis von DNA-Sequenzen geeignet, die

20 nicht in allen *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen vorkommen.

	C-47-1	GCGCGATCTTCTCCACTTCATCGG
	C-45	CGAGGAGTTTCGGACCCGCTTTGA
	C-46	AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT
25	C-46_1	CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC
	C-spezifisch-1	GCATCATTGCGCGTCACATCTGGT
	pKL-3	TCTGAACTGCGGCTATCACCTGGA
	pKL-11	AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT

- 24 -

	PAGI-1-1	TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG
	PAGI-1-8	TGGTAGCTCTCGACGTACTGGCTG
	SG17M-1	CCCGTTGCTCATAACCCGTTCTG
	SG17M-4	AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG
5	C-Inselspez.-4	GCGCCTTCTCCTCTTTGCAGATGT
	C-Inselspez.-5	CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC
	TB-C47-3	TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG
	TB-C47-4	CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC
	fliC a A-T_wt_2	CAAGATCGCCGCAGCGGTCAACGAC
10	fliC a A-T_mut_2	CAAGATCGCCGCTGCGGTCAACGAC
	PA2221	CAGTTGTCGCCAGGTCTGGAGAATCC
	PA3835	CACATCAATGTCAGCCCACGCCA
	PA0728	CTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTC
	PA2185	ACGAGGGTGATGGCTGGGAATACG
15	PA0636	GCCAATTGGGTCAGCAAGCAACG
	PA0722	CGTGTGCGCGAACTCGCATGGC
	Pyov-Rez-Type_I	CCTGAATCCGACCATTCGCGAGTC
	Pyov-Rez-Type_IIa	TCGGACTGTACTCCTACGAAGCAGC
	Pyov-Rez-Type_IIb	CCAATCCCTATCGCTGGAACCGTACC
20	Pyov-Rez-Type_III	GCTCGGGACTCGCATTTTCGTCC
	Pyov-Rez-Fpv_B	GCGTTATTGCTCGGTCTCTCCTCG
	C-Inselspez.-1	GACCGCAAGCAGAAACGGCATGC
	C-Inselspez.-6	CCATGGTCGGAACAGGCACGATATGC
	C-47-1_2	CCACTCGATCATGTTGAGCATCGGCTCC
25	SG17M-8	GGTTAGTCCCTTCTGCCCCGCATCG

Die folgenden Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zum Nachweis von Pathogenitätsinseln geeignet:

- 25 -

	47D7-1_1	GTGTCACGGCCCATGTCTAGCAGC
	47D7-2	GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT
	fla-insel-1	ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT
5	Fla-Insel-2_orfA	CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG
	Fla-Insel-2_orfC	CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG
	Fla-Insel-2_orfI	CCTGGACCTCTCCAAGGTTGCCT
	Fla-Insel-2_orfJ	GCCATTCCGACGACCAAACAAGGC
	47D7-2_2	AGGCCATGGGCTAGCCGGATGC
10	PAPI-2-XF1753	CGAAGCGTAGGGTCTTCGTAGCC
	PAPI-2-acetyltrans	TGCGAGGACCAGAAACCTTGATGG
	PA0980	CGGTATGAAGATGGGTGGTTGGGTCG
	LES	TGCATAGGAGTCATGCCGACAGCA
	PKLC102-unbekannt	GCCTGCCTACTTGTTCCCAACGC
15	PKLC102-adhesin	GGCTGTATTGCCC GCCATTCTCC
	PKLC102-stoffw	CGACAGACAGAAAGGGTTCTTGCGC
	pKL-1	CACCATGCAAATGCTCGATGGACTGC
	TB-C47-3_2	GCAGGCGTCCAAGTTGGAGCTCTCC
	PAPI-1_pili-chap	GGAACACAACGTGGGGCGTGAC
20	PAPI-1_lum_bin_pro	CCAGTTGGCACCACCATGCTTGC

Die folgenden Nukleinsäure-Sondenmoleküle bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zum Nachweis von krankheitsassoziierten Genen wie *exoS* und *exoU* geeignet:

25

exoS-1_1	CAGCCCAGTCAGGACGCGCA
exoU	CGCCAGTTTGAGAACGGAGTCACC
exoU_1	AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC

- 26 -

Die folgenden Nukleinsäure-Sondenmoleküle bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zur Identifizierung des Flagellentyps geeignet:

- | | | |
|---|--------|--------------------------|
| 5 | fliC b | GCCGACCAACTGAACTCCAACTCG |
| | fliC a | GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA |

Gegenstand der Erfindung sind neben den Oligonukleotid-Sonden mit den vorstehend aufgeführten Sequenzen auch Abwandlungen der vorstehend genannten

10 Oligonukleotide, die trotz der Abweichungen in der Sequenz und/oder Länge eine spezifische Hybridisierung mit Ziel-Nukleinsäuren bzw. Target-Nukleinsäuren zeigen und dadurch einen spezifischen Nachweis von Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* und insbesondere die Geno- und Pathotypisierung *Pseudomonas aeruginosa* gewährleisten.

15

Unter diese Abwandlungen fallen insbesondere

- a) Nukleinsäuremoleküle, die (i) mit einer der obigen Oligonukleotid-Sequenzen in mindestens 80%, bevorzugt in mindestens 90% und besonders bevorzugt in
- 20 mindestens 92%, 94%, 96% der Basen übereinstimmen, oder die (ii) sich von obigen Oligonukleotid-Sequenzen durch eine oder mehrere Deletionen und/oder Additionen unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Target-Nukleinsäuren von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ermöglichen.
- 25 b) Nukleinsäuremoleküle, die mit einer Sequenz, die zu einem der unter a) genannten Nukleinsäuremoleküle komplementär ist, unter stringenten Bedingungen (siehe unten) hybridisieren.

c) Nukleinsäuremoleküle, die eine Oligonukleotid-Sequenz nach a) oder b) umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen und eine spezifische Hybridisierung mit Target-Nukleinsäuren ermöglichen.

5

Der Grad der Sequenzidentität eines Nukleinsäure-Sondenmoleküls mit den oben explizit genannten Oligonukleotid-Sondenmolekülen kann mit üblichen Algorithmen bestimmt werden. Geeignet ist hierzu beispielsweise das Programm zur Bestimmung der Sequenzidentität, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (auf dieser
10 Seite z.B. der Link "Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]") zugänglich ist.

"Hybridisieren" kann im Rahmen dieser Erfindung gleichbedeutend sein mit "komplementär". Im Rahmen dieser Erfindung sind auch solche Oligonukleotide umfasst, die mit dem (theoretischen) Gegenstrang eines erfindungsgemäßen
15 Oligonukleotids einschließlich der erfindungsgemäßen Abwandlungen hybridisieren.

Der Begriff "stringente Bedingungen" steht allgemein für Bedingungen, unter denen eine Nukleinsäuresequenz präferentiell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen.
20 Stringente Bedingungen sind z.T. sequenzabhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem
25 definierten pH liegt. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand hybridisieren.

Es versteht sich, dass der Fachmann die Konzentrationen der Bestandteile des Hybridisierungspuffers derart auswählen kann, dass die gewünschte Stringenz der Hybridisierungsreaktion erzielt wird. Unter Einsatz der stringenten Bedingungen
5 kann der Fachmann feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremoleküle einen spezifischen Nachweis von Target-Nukleinsäuren von *Pseudomonas aeruginosa* ermöglicht und somit im Rahmen der Erfindung zuverlässig eingesetzt werden kann.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen
10 Microarray-Vorrichtung sind auf mindestens einem Array-Element sog. Kontrollsonden angeordnet. Derartige Kontrollsonden dienen z.B. zur Kontrolle der erfolgten Target-Markierung, der Amplifikationsreaktion, der Hybridisierungsreaktionen sowie – insbesondere bei Nachweisverfahren durch Präzipitation – der Färbung des Niederschlags.

15 Derartige Kontrollsonden weisen z.B. eine spezifische Komplementarität entweder zu einem extern zugegebenen Target oder zu einem in allen mit dem Array zu untersuchenden Samples in ausreichender Konzentration vorhandenen Target auf. Unter ausreichender Konzentration wird in diesem Zusammenhang eine
20 Konzentration an Targetmolekülen verstanden, die zu einem signifikanten, d.h. deutlich detektierbaren Signal nach der Wechselwirkung mit den Sonden führt. Vorzugsweise sind die Array-Elemente, auf denen derartige Kontrollsonden angeordnet sind, über die gesamte Fläche des Arrays verteilt, besonders bevorzugt sind sie gleichmäßig verteilt. Eine Verteilung über die gesamte Fläche des Arrays
25 bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass sich ausgehend von dem Mittelpunkt der Array-Oberfläche in verschiedenen Abständen und verschiedenen Richtungen Array-Elemente mit derartigen Kontrollsonden befinden. Eine gleichmäßige Verteilung bedeutet vorzugsweise eine Anordnung der Array-Elemente

mit derartigen Kontrollsonden als einheitliches Raster, beispielsweise als 10x10-Raster, bei dem jedes zehnte Array-Element ein derartiges Array-Element mit Kontrollsonden ist. Diese Ausführungsform ermöglicht z.B. die Normalisierung von experimentellen Schwankungen, die nach der Herstellung des Arrays u.a. in
5 Abhängigkeit von dem Ort des Array-Elements auf der Array-Oberfläche auftreten können.

Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*
10 in einer Probe bereitgestellt wird, welches die folgenden Schritte umfasst:

- a) In Kontakt bringen der Probe mit einem wie vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Chip mit Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas*
15 *aeruginosa*; und
- b) Detektion der Wechselwirkung zwischen den Oligonukleotid-Sonden und in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren.

Die zu untersuchenden Target-Nukleinsäuren bzw. die nachzuweisenden und zu typisierenden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme können in jeder Art von Probe, vorzugsweise in einer biologischen Probe vorliegen. Insbesondere wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Untersuchung medizinischer Proben, z.B. von Stuhlproben, Blutkulturen, Sputum, Gewebeproben (auch Schnitten), Wundmaterial, Urin, Proben aus dem Respirationstrakt, Implantaten und Kathetheroberflächen
25 eingesetzt werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens werden die in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren vor der

- 30 -

Detektion amplifiziert. Die Amplifikation erfolgt üblicherweise durch herkömmliche im Stand der Technik bekannte PCR-Methoden. Vorzugsweise wird die Amplifikation als Multiplex-PCR ausgeführt (siehe auch WO 97/45559). Bei einer Multiplex-PCR wird mehr als ein Primer pro Template-DNA in der Polymerase-
5 Kettenreaktion verwendet. Das Ziel einer Multiplex-PCR ist die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Bereiche der Target-DNA, um auf diese Weise Zeit zu sparen und Kosten zu minimieren.

Vorzugsweise werden bei der Amplifikation durch Multiplex-PCR Primer eingesetzt,
10 die in etwa dieselbe Schmelztemperatur und in etwa dieselben Bindungskinetiken aufweisen. Auf diese Weise wird eine gleichmäßige Amplifikation sämtlicher Target-Nukleinsäuren gewährleistet und so ein exakter Nachweis auch in unterschiedlicher Ausgangskonzentration vorliegender Target-Nukleinsäuren sichergestellt. Unter einer in etwa gleichen Schmelztemperatur bzw. einem ähnlichen
15 Schmelzpunkt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Schmelztemperatur bzw. ein Schmelzpunkt verstanden, die bzw. der vorzugsweise höchstens 5°C und besonders bevorzugt höchstens 3°C von dem Vergleichsschmelzpunkt abweicht.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Amplifikation linear,
20 d.h. nur auf einem DNA-Strang der Target- bzw. Template-Nukleinsäure durchgeführt. Dadurch wird vermieden, dass auch nur geringe Unterschiede bei den Schmelzpunkten und Bindungskinetiken der Primer wie bei der exponentiellen Amplifikation mittels herkömmlicher PCR zu großen Unterschieden in den nach Abschluss der Amplifikation vorliegenden Konzentrationsverhältnissen der Target-
25 Nukleinsäuren führen, was einen Nachweis von nur geringer Ausgangskonzentration vorliegenden Target-Nukleinsäuren neben in hohen Ausgangskonzentrationen vorliegenden Target-Nukleinsäuren verhindern würde.

- 31 -

Insbesondere haben die im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Primer die nachstehend angegebenen Mengen und Sequenzen (alle Primer sind in 5'-3'-Richtung notiert). Die im Folgenden aufgeführten Primer sind jedoch auch für beliebige andere dem Fachmann bekannte Verfahren zur Amplifikation von

5 Nukleinsäuren geeignet.

47-1/23

ACGCGGATGTCCTGGATTTGG

10 47-1/39

CTGAAGAAGGGGCGCTACGCG

47-2/22

GCGTACCGGGCAAGGTGATAG

15

47-2/52

CTCGGTGAAACATCGGGAGGG

C45/18

20 TCATCCAGCAAGCCATTGCGC

C45/60a

GGAGTCGCTTTCCGCCATCG

25 C45/60b

TGGAGTCGCTTTCCGCCATCG

- 32 -

C46/15

AAGGGCGTTTCACGCTGACGC

5 C46/22

ATCCGGAAGGGCGTTTCACG

C46/88

TCCACACCTCAGACTTCGGCG

10

C47-1/43

TATTGACGACCTACCGCGCGC

C47-2/56a

15 GCAACTGATGTTGCGCCAGC

C47-2/56b

CGCAACTGATGTTGCGCCAGC

20 C47-2/59

ACACGCAACTGATGTTGCGCC

CIS-4/36

TGTCCCGGCTCAGTTCAACG

25

CIS-4/50

AACACCTTGGCGTTTGTCCC

- 33 -

CIS-4/51

GCAACACCTTGGCGTTTGTCC

5 CIS-5/4

TCAAGCTCGTTGTGGACCGC

CIS-5/48

GTTACGACGGCGTGCTGTCGG

10

CSP-1/39a

ACGCAACGTATTCGGCGACCC

CSP-1/39b

15 CGCAACGTATTCGGCGACCC

fliAT/28

AGCTGATGGTATCGCCGTCGC

20 fliAT/72

CTAGTGATCGCACCGGAGCC

oriC/20

AGCCTCGACACCGGTTCTCG

25

oriC/54

TCGTTTCATCCCCAGGCTTCG

- 34 -

oriC/59

ACCATCTCGTTCATCCCCAGG

5 oprL/53

TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG

oprL/65

TCGACGCGACGGTTCTGAGCC

10

fliCb/36

TGACGTTCTCGCCGGTAGCG

fliCb/65

15 CAGTAGCGGTACCGGTCTGCG

fliCb/66

CAGTAGCGGTACCGGTCTGC

20 alkAG/27

TTCCTCGCCGGCATAGTAGGC

alkGA/32

GGGGTCGAGACGTGTACATGG

25

alkGA/51

CGAGGACGAGGCATCTTCCGG

- 35 -

citAG/4

GCAGGTAGCAGGTTTCCAGG

5 citAG/46

AACTGTTCCCTTCTGCGCGGCG

citGC/8

TGATCGGCTTGGTCTCGCAGG

10

citGC/11

GCTGATCGGCTTGGTCTCGC

citGC/75

15 GAGGCGTTCTGCTCGTGGTCG

oprI/12

TTTTTCCAGCATGCGCAGGG

20 oprI/17

GCTGGCTTTTTCCAGCATGCG

oprI/22

TTGCGGCTGGCTTTTTCCAGC

25

am7CA/1

TTGGGATAGTTGCGGTTGGC

- 36 -

am7CA/27

CGTAGGCGATCTTCACCCGC

5 am7CA/29

TGGCGTAGGCGATCTTCACCC

am3CT/21

GGCGAGATAGCCGAACAGGC

10

am3CT/22

GCGGCGAGATAGCCGAACAGG

am3CT/69

15 CACTTGCTGCTCCATGAGCC

am2CT/35

GAGGTCGAGCAGGCTGATGC

20 am2CT/42

TAGGTCGCGAGGTCGAGCAGG

am2CT/92

GTCCTTCTGCACCGAGTCGG

25

am1GA/49

CGCATCTTGTCCTGGGTCAGG

- 37 -

am1GA/58

TCGTCGAGGCGCATCTTGTCC

5 am45/1

ACGTCGAGGTGGGTCTGTTCG

am45/96

GTAGCCTTCGGCATCCAGCG

10

am6TC/60

TCGGCATTGGGATAGTTGCGG

GI11/15

15 CCTCCTGTCTCATGCCGATGC

GI11/59

GCATTCGCCACGGAAGGAAGG

20 GI11/71

GAAGGCATCATGGCATTGCGC

GI18/62

GTCATGGGGTTTCCCAGAGACC

25

fliCa/41

GATCGCGATGTCGACGGTGCC

- 38 -

fliCa/42

CGATCGCGATGTCGACGGTGC

5 fliCa/46

TGCCGATCGCGATGTCGACG

SG-1/40

GACGAATACCCAGCTGCGTGG

10

SG-1/43

GCAGACGAATACCCAGCTGCG

SG-4/1

15 CGCGACGTCGTGACGTCAGC

SG-4/67

ACTTTCGGCTCTTCGGGCTGG

20 TB46/21

AGGTAGAGACTCGGGGGAACC

TB46/45

TCGTTTTTCGGTCATGGCCAGG

25

TB471/22

TTCCGCGACGAACATCCGTGG

- 39 -

TB471/25

CGCTTCCGCGACGAACATCCG

5 TB472/36

GGATCGCTTCCGATAGGGCAGC

TB472/84

AGAGGCATGGGTCTGTACCG

10

TB473/34

TCTGTCAATCCCCTTTGGGG

TB473/41

15 AGCCCCTTTCTGTCAATCCCC

TB474/36

GGCTTCCTACCGAAGGTCAGG

20 TB474/41

TGAGGGCTTCCTACCGAAGG

exoS/31

TTCAAGGTCATGGGCAATGCC

25

exoS/37

AGTCCCTTCAAGGTCATGGGC

- 40 -

exoU/22

GCCGACTGAGCTGTAGCTCGG

5 exoU/23

GGCCGACTGAGCTGTAGCTCG

exoU/42

ACCAGACTGGTCAATGGTGG

10

flins/2

CCCGTGTTTCCGTAGACCTTGC

pKL11/49a

15 AGCAGTTACCCACAGCATGG

pKL11/49b

CAGCAGTTACCCACAGCATGG

20 pKL3/47

CTACACTCCAACCGCTGGTCC

pKL3/50

GACCTACACTCCAACCGCTGG

25

pKL3/80

TTCCTTGCTGCCGAGAAGC

- 41 -

pKL7/14

TAATAGGCGAGCCTGCCGTCC

5 47D7nw1a

TCCACGCCGAGGGACGTGCC

47D7nw1b

GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC

10

C46-nw1a

CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC

C46-nw1b

15 CCAATGCCCAGGGCCAGCGGA

C46-nw1c

CGCTGGCAGTTCCGCTGGCC

20 ExoSnw1a

CAGGGTCGCCAGCTCGCTCGCC

ExoSnw1b

AGGGTCGCCAGCTCGCTCGC

25

ExoUnw1a

AGTGATCTGCCGCGGCCCTGCC

- 42 -

ExoUnw1b

GTGATCTGCCGCGGCCCTGC

5 OrfA-1

GTTCCACAGGCGCTGCGGCGC

OrfA-2

GTTCCACAGGCGCTGCGGCG

10

OrfA-3

CAAAGCCCCTGGTCGCGCGG

OrfC-1

15 GCAGCTTTTCCACCGCCGGCGG

OrfI-1

AAACTGCCCCGCCCCCATCC

20 OrfI-2

GGAAAAACTGCCCCGCCCCC

OrfJ-1

ACGCTCGCAGCGCCTCACGCG

25

OrfJ-2

GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC

- 43 -

PA2221/37_Pa-P_064
TTCCTGGGCCAGAGTTGGACC

5 PA2221/66_Pa-P_065
AGCTTAAGGCCGTGGCACTCG

PA3835/46_Pa-P_066
CCGGAGAATTCGCGTCCACC

10 PA3835/72_Pa-P_067
TGCTGACGATGAAGCCCCAGC

47-22/3_Pa-P_072
15 AGGAGGCCGATGACAACACCC

47-22/67_Pa-P_073
TGCCGATTCCATGCTCACGCC

20 pI2X1753/29_Pa-P_074
ACGACGTCACCGTCGAGACCG

pI2X1753/69_Pa-P_075
ACCGCCTTTCTGGTGAGCTGG

25 PA0728/42_Pa-P_076
AGCCAAGACGGTTGTTTCGCGG

- 44 -

PA0728/88_Pa-P_077

TCAATGACGCCGAGTTGGCGC

5 PA2185-1/42_Pa-P_078

CTCGGACAGGTTCACGCTGG

PA2185-1/70_Pa-P_079

GCCATTCGCTGCAACACCTCC

10

pI2actrf/39_Pa-P_085

GCGCGCGTTTCGAGAAACAGG

pI2actrf/93_Pa-P_086

15 CGGAGGTTGAAAAGCTGGCCC

PA0636/29_Pa-P_087

ATGCCATCGTTGAAGGCACCGC

20 PA0636/30_Pa-P_088

TGCCATCGTTGAAGGCACCG

PA0722/4_Pa-P_089

TCTGGCGGAATCAGGTAGGCC

25

PA0722/55_Pa-P_090

CTTCCGGGGAGAAACCACCG

- 45 -

PA0980/45_Pa-P_093

ACCTCCAGCACCGACACACC

5 PA0980/53_Pa-P_094

ATCCGATCCACCTCCAGCACC

FpvaI/23_Pa-P_095

CGTTCAGGTCGTAGACCGCGC

10

FpvaI/84_Pa-P_096

GCGATACCAACTGTCCTGCGGC

FpvaIIa/34_Pa-P_097

15 TGCCGAAGGTGAATGGCTTGCC

FpvaIIa/65_Pa-P_098

CCTGATGGTCCGATCCCAGC

20 FpvaIIb/44_Pa-P_099

GCCGAGGGTCAAGAACCACTGG

FpvaIIb/67_Pa-P_100

TCTTGGCCCAGTCATAGCGGC

25

FpvaIII/16_Pa-P_101

TAACCCCAAGGCCCATTTGGAGG

- 46 -

FpvaIII/31_Pa-P_102

GCCACCGCCTTCGAATAACCCC

5 FpvB/57_Pa-P_103

AATTGCTCGAGGGATGCGGC

FpvB/92_Pa-P_104

GGTCGAAACGGATGCGCAGG

10

LES/11_Pa-P_105

GCCCCGCGTCATTTTCACGTCG

LES/57_Pa-P_106

15 AATGCTCTGGGCAACGAGCC

pKLunbek/63_Pa-P_107

CTACCCAGCTTGGGCGTAGC

20 pKLunbek/141_Pa-P_108

AAGCGATAGCCGTGCTCCTGC

pKLadh/13_Pa-P_109

CCGGCTATATCCGCGGCTACC

25

pKLadh/59_Pa-P_110

ATTGGCGCTGCTGTTTACGCCC

- 47 -

pKLStw/30_Pa-P_111

GGTGGCGTCGGGTTTTTCTGC

5 pKLStw/46_Pa-P_112

AGGTCGTAGCGGAAGGTGGTGG

pKL-1/22_Pa-P_113

ATCTGAACCGAGGGGATCCGC

10

pKL-1/61_Pa-P_114

CCCGGGAGTCATTGGTCTGG

T47-32/19_Pa-P_117

15 GCCTGTTGGACCCCTTTGACC

T47-32/26_Pa-P_118

TACTCCTGCCTGTTGGACCCC

20 pI1pil/15_Pa-P_121

CGCTCAAGCGCTATCCCACC

pI1pil/41_Pa-P_122

CGCCATCGGCCTGTACAACG

25

pI1lumin/87_Pa-P_123

CGGTAGAGAGCTGGGTTGGC

- 48 -

pIllumin/209_Pa-P_124
AACCTGGAGCTAGGGCAGAGC

5 C-Ins1/39_Pa-P_125
GGTGCTCGACCCAAGCATCG

C-Ins1/57_Pa-P_126
TCCTTGAGTTCCTTGGCGCGG
10

C-Ins6/42_Pa-P_131
CAACACGCGACTGGCGATCC

C-Ins6/61_Pa-P_132
15 TACATCATCCGCAACGGCGGC

C47-12/2_Pa-P_137
TATTGACGACCTACCGCGCGCC

20 C47-12/94_Pa-P_138
CACCAAGAACCCGCTGCTCG

SG-8/14_Pa-P_141
ATCGTGGCAGGATGTCCACCG
25

SG-8/86_Pa-P_142
TAGGCGGGCCTTTTGAAGGTGC

- 49 -

Gegenstand der Erfindung sind neben Primern mit den vorstehend aufgeführten Sequenzen auch Abwandlungen der obigen Primer, die trotz der Abweichungen in der Sequenz und/oder Länge eine spezifische Hybridisierung mit den Template-Nukleinsäuren der jeweiligen *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme zeigen und sich
5 dadurch für den Einsatz bei der Amplifikation der Target-Nukleinsäuren eignen.

Hierunter fallen insbesondere

- 10 a) Primer, die (i) mit einer der oben explizit genannten Primersequenzen in mindestens 80%, bevorzugt in mindestens 90% und besonders bevorzugt in mindestens 92%, 94%, 96% der Basen übereinstimmen, oder die (ii) sich von obigen Primersequenzen durch eine oder mehrere Deletionen und/oder Additionen unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Template- bzw. Target-Nukleinsäuren von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen ermöglichen.
- 15 b) Primermoleküle, die mit einer Sequenz, die zu einer der unter a) genannten Primermoleküle komplementär ist, unter stringenten Bedingungen (siehe oben) hybridisieren.
- 20 c) Nukleinsäuremoleküle, die die Sequenz eines Primermoleküls nach a) oder b) umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Target-Organismen ermöglichen.
- 25 Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden für die Amplifikation pro Target-Nukleinsäure zwei geeignete Primer parallel eingesetzt.

- 50 -

Der Nachweis erfolgt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise dadurch, dass die gebundenen bzw. hybridisierten Target-Nukleinsäuren mit mindestens einer Markierung versehen sind, die in Schritt b) detektiert wird.

- 5 Wie bereits vorstehend erwähnt, ist die Markierung, die an die Targets oder Sonden gekoppelt ist, vorzugsweise eine detektierbare Einheit oder eine über eine Ankergruppe an die Targets oder Sonden gekoppelte detektierbare Einheit. Hinsichtlich der Möglichkeiten der Detektion bzw. der Markierung ist das erfindungsgemäße Verfahren äußerst flexibel. So ist das erfindungsgemäße
- 10 Verfahren mit einer Vielzahl physikalischer, chemischer oder biochemischer Detektionsverfahren kompatibel. Voraussetzung ist lediglich, dass die zu detektierende Einheit bzw. Struktur direkt an eine Sonde oder ein Target, beispielsweise ein Oligonukleotid gekoppelt bzw. über eine mit dem Oligonukleotid koppelbare Ankergruppe verknüpft werden kann.
- 15 Die Detektion der Markierung kann auf Fluoreszenz, Magnetismus, Ladung, Masse, Affinität, enzymatischer Aktivität, Reaktivität, einer Goldmarkierung und dergleichen beruhen. So kann die Markierung beispielsweise auf der Verwendung von Fluorophor-markierten Strukturen bzw. Bausteinen basieren. In Verbindung mit
- 20 der Fluoreszenz-Detektion kann die Markierung ein beliebiger an Targets oder Sonden während oder nach deren Synthese koppelbarer Farbstoff sein. Beispiele hierfür sind Cy-Farbstoffe (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Alexa-Farbstoffe, Texas-Rot, Fluorescein, Rhodamin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), Lanthanide wie Samarium, Ytterbium und Europium (EG&G,
- 25 Wallac, Freiburg, Deutschland).

Neben Fluoreszenz-Markern können im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Markierung bzw. als Detektiereinheit, die mit den Targets bzw. Sonden gekoppelt ist,

auch Lumineszenz-Marker, Metall-Marker, Enzym-Marker, radioaktive Marker und/oder polymere Marker eingesetzt werden.

- 5 Ebenso kann eine Nukleinsäure als Markierung (Tag) genutzt werden, die durch Hybridisierung mit einem markierten Reporter detektiert werden kann (Sandwich-Hybridisierung). Einsatz zum Nachweis des Tags finden diverse molekularbiologische Nachweisreaktionen wie Primer-Extension, Ligation und RCA.
- 10 Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die detektierbare Einheit über eine Ankergruppe mit den Targets oder Sonden gekoppelt. Bevorzugt verwendete Ankergruppen sind Biotin, Digoxigenin u.dgl. Die Ankergruppen werden in einer anschließenden Reaktion mit spezifisch bindenden Komponenten, beispielsweise Streptavidin-Konjugaten oder Antikörper-Konjugaten
- 15 umgesetzt, die selbst detektierbar sind oder eine detektierbare Reaktion auslösen. Bei Einsatz von Ankergruppen kann die Umsetzung der Ankergruppen in detektierbare Einheiten vor, während oder nach Zugabe der Probe umfassend die Targets bzw. ggf. vor, während oder nach der Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sonden erfolgen.
- 20 Die Markierung kann erfindungsgemäß auch durch Wechselwirkung eines markierten Moleküls mit den Sonden-Molekülen erfolgen. Beispielsweise kann die Markierung durch Hybridisierung eines wie vorstehend beschrieben markierten Oligonukleotids mit einer Oligonukleotid-Sonde bzw. einem Oligonukleotid-Target
- 25 erfolgen.

Weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Markierungsverfahren und Nachweissysteme sind beispielsweise in Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik,

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998, Kapitel 23.3 und 23.4 beschrieben.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden
5 Nachweisverfahren eingesetzt, die im Ergebnis ein Addukt mit einem bestimmten
Löslichkeitsprodukt, das eine Präzipitation zur Folge hat, liefern. Zur Markierung
werden insbesondere Substrate eingesetzt, die in ein schwer lösliches, üblicherweise
gefärbtes Produkt umgesetzt werden können. Beispielsweise können bei dieser
Markierungsreaktion Enzyme verwendet werden, die den Umsatz eines Substrats in
10 ein schwer lösliches Produkt katalysieren. Reaktionen, die geeignet sind, um zu
einem Niederschlag an Array-Elementen zu führen, sowie Möglichkeiten für die
Detektion des Niederschlags sind beispielsweise in der internationalen
Patentanmeldung WO 00/72018 und in der internationalen Patentanmeldung
WO 02/02810 beschrieben, auf deren Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen
15 wird.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen
Verfahrens sind die gebundenen Targets mit einer Markierung versehen, die die
Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwer löslichen Niederschlag auf dem
20 Array-Element katalysiert, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung
stattgefunden hat bzw. die als Kristallisationskeim für die Umwandlung eines
löslichen Substrats zu einem schwer löslichen Niederschlag auf dem Array-Element
wirkt, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat.

25 Der Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens erlaubt auf diese Weise die
simultane qualitative und quantitative Analyse einer Vielzahl von Sonden/Target-
Wechselwirkungen, wobei einzelne Array-Elemente mit einer Größe von $\leq 1000 \mu\text{m}$,

vorzugsweise von $\leq 100 \mu\text{m}$ und besonders bevorzugt von $\leq 50 \mu\text{m}$ realisiert werden können.

In der Immunzytochemie und bei immunologischen Mikrotiterplatten-basierten Tests
5 ist der Einsatz von enzymatischen Markierungen bekannt (siehe E. Lidell und I. Weeks, Antibody Technology, BIOS Scientific Publishers Limited, 1995). So katalysieren beispielsweise Enzyme den Umsatz eines Substrats in ein schwerlösliches, in aller Regel gefärbtes Produkt.

10 Eine weitere Möglichkeit des Nachweises molekularer Wechselwirkungen auf Arrays besteht im Einsatz von Metallmarkierungen. Hierbei werden beispielsweise kolloidales Gold oder definierte Goldcluster mit den Targets gekoppelt, ggf. über bestimmte Vermittlermoleküle wie Streptavidin. Die durch die Goldmarkierung entstehende Färbung wird vorzugsweise durch nachfolgende Reaktion mit unedleren
15 Metallen wie z.B. Silber verstärkt, wobei die mit den Targets gekoppelte Goldmarkierung als Kristallisationskeim bzw. Katalysator beispielsweise für die Reduktion von Silberionen zu einem Silberniederschlag wirkt. Die mit Goldmarkierungen gekoppelten Targets werden im Folgenden auch als Goldkonjugate bezeichnet.

20 Bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch eine relative Quantifizierung der Sonden-/Target-Wechselwirkung erfolgen. Die relative Quantifizierung der Konzentration der gebundenen Targets auf einem Sonden-Array durch Nachweis eines Präzipitats bzw. eines Niederschlags erfolgt über die
25 Konzentration der mit den Targets gekoppelten Markierungen, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwerlöslichen Niederschlag auf dem Array-Element, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat, katalysieren bzw. als Kristallisationskeim für derartige Reaktionen wirken. Beispielsweise beträgt im Fall

von mit Nanogold markierten HPLC-gereinigten Oligonukleotidsonden das Verhältnis von gebundenem Target zu Goldpartikel 1:1. In anderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann es ein Vielfaches oder auch einen Bruchteil davon betragen.

5

Die Detektion bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens erfolgt somit durch Messung der Transmissionsänderung, Reflexion oder Streuung, die durch den Niederschlag hervorgerufen wird, der auf den Array-Elementen, an denen eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat, durch die katalytische Wirkung der mit den gebundenen Targets gekoppelten Markierung erzeugt wird.

10

Die Lichtabsorption wird im Fall der Kopplung von kolloidalem Gold oder definierten Goldcluster mit den Targets bereits durch die Gegenwart dieser metallischen Markierungen hervorgerufen. Zur Verstärkung der Lichtabsorption wird allerdings vorzugsweise katalytisch durch derartige Wechselwirkungshybride, d.h. die mit einer Markierung wie beispielsweise kolloidalem Gold oder definierten Goldclustern versehene Targets, ein nicht transparentes Präzipitat abgeschieden. Als besonders vorteilhaft hat sich im Fall von Goldkonjugaten die Verwendung von Silber als Präzipitat herausgestellt.

15

20

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird somit in Schritt c) der zeitliche Verlauf der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen in Form von Signalintensitäten detektiert. Auf diese Weise kann eine genaue Bestimmung der relativen quantitativen Menge an gebundenen Targets gewährleistet werden. Eine derartige Vorgehensweise ist ausführlich in der internationalen Patentanmeldung WO 02/02810 beschrieben, auf deren Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

25

- Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Kits zur Durchführung der vorstehend beschriebenen Verfahren zur Verfügung gestellt. Die in diesen Kits enthaltenen Hybridisierungsanordnungen bzw. Chip-Vorrichtungen sind z.B. in den internationalen Patentanmeldungen WO 03/059516, WO 01/02094 und WO 03/031063 beschrieben. Auf die in diesen Dokumenten enthaltene Offenbarung bezüglich der Mikroarray-Anordnungen wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.
- 10 Außer den dort beschriebenen Hybridisierungsanordnungen, vorzugsweise einem ArrayTube®, umfassen die Kits als wichtigen Bestandteil die erfindungsgemäße Microarray-Vorrichtung bzw den erfindungsgemäßen Biochip und insbesondere die vorstehend beschriebenen für die nachzuweisenden *Pseudomonas aeruginosa*-
- 15 Stämme spezifischen Nukleinsäure-Sondenmoleküle, die auf dem Träger angeordnet sind. Gegebenenfalls weiter enthalten sind entsprechende Primer, Hybridisierungspuffer und Konzentrate von entsprechenden Waschlösungen.

Das folgende Beispiel soll die Erfindung erläutern, ohne sie einzuschränken:

20 Beispiel

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ein Detektionsverfahren entwickelt, mit dem die Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* innerhalb von sechs Stunden, ausgehend von den Bakterien auf einer Agar-Platte, durchgeführt werden kann. Hierzu werden nur grundlegende Labormethoden, wie z.B. PCR und
- 25 Geräte, die zur Grundausstattung eines molekularbiologischen Labors gehören, benötigt. Ein kritischer Schritt hierbei ist die PCR, bei der über 40 verschiedene Sequenzen im gleichen Reaktionsansatz parallel amplifiziert werden. Um dies zu

- 56 -

erreichen, wurden bei einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens 80
DNA-Primer so optimiert, dass sie in etwa gleiche Schmelzpunkte und
Bindungskinetiken aufweisen. Weiterhin wurden die Template-Nukleinsäuren nur
linear, d.h. auf einem DNA-Strang amplifiziert, um somit auch die Auswirkungen
5 geringer kinetischer Unterschiede zu minimieren. Diese Optimierung ermöglicht die
Verwendung einer Multiplex-PCR zur Target-Amplifikation.

Mit dem im Rahmen der vorliegenden Erfindung bereitgestellten DNA-Chip ist es
daher möglich, *Pseudomonas aeruginosa* schnell und einfach in einem
10 diagnostischen Routinelabor innerhalb eines Tages zu untersuchen und so z.B. bei
Verdacht auf eine nosokomiale Ausbreitung dieses Erregers schnell reagieren zu
können.

Im Folgenden ist ein Versuchsprotokoll angegeben:

15

a) Vorbereitung der Bakterien

2 Impfösen der Bakterienkultur (20 µl Bakterien von einer LB-Agarplatte) in 1,5 ml
H₂O aufnehmen

20 Zentrifugation (3.000 x g, 6 min)

Überstand abnehmen

Pellet 4 x waschen:

Resuspension in 5 mM EDTA

Zentrifugation (14.000 x g, 5 min)

25 Überstand abnehmen

Pellet in 50 µl dest. H₂O resuspendieren

- 57 -

b) Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die zu untersuchenden DNA-Sequenzen der Bakterien werden in einer Polymerase-
 5 Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

	Polymerase:	Terminator- Polymerase (New England Biolabs)	
10	dNTPs:	je 2 mM dATP, dGTP, dCTP, 1,5 mM dTTP 0,5 mM Biotin-dUTP (Roche)	
15	Primer: zu dem DNA-	Mischung aus je zwei 21 bp Oligonukleotiden für jede detektierende Sequenz. Die Primer haben gleiche Schmelzpunkte und Bindungskinetik und binden auf gleichen Strang ca. 100 Basen vor der untersuchten Sequenz. Die verwendete Mischung hat eine Gesamtkonzentration an Oligonukleotiden von 5	
20	µmol/l. Die 17	Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abbildung dargestellt.	
25	Reaktionsansatz:	10x Reaktionspuffer	2,5 µl
		dNTP- Mischung	2,5 µl
		Primer	2,5 µl
		DMSO	1,2 µl
		Bakterien-Suspension	8,0 µl
		Terminator-Polymerase	0,5 µl
		Wasser	7,8 µl

- 58 -

= 25 µl

Reaktionsablauf:

5	Start:	96°C	300 s
	40 Zyklen	60°C	20 s
		72°C	40 s
		96°C	60 s
10	Ende	10°C	

c) Hybridisierungsassay

Die eingesetzten Oligonukleotid-Sonden sowie die Anordnung der Oligonukleotid-Sonden auf dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurechip sind in den Abbildungen 18 bis 21 gezeigt.

Die Chips werden 2 x 5 Minuten mit 500 µl des Hybridisierungspuffer (6 x SSPE / 0,1%SDS/2% w/v Blocking Reagenz (Roche)) in einem Thermomixer gewaschen (30°C, 550 rpm).

20 µl des PCR-Produkts werden zusammen mit 80 µl Hybridisierungspuffer in einem Heizblock denaturiert (96°C, 5 min) und auf Eis abgekühlt.

25 Diese Sondenlösung wird auf den ArrayTube®-Chip (Clondia) gegeben und eine Stunde bei 60 °C und 550 rpm inkubiert (Thermomixer).

Die Sondenlösung wird verworfen und der DNA-Chip gewaschen:

- 59 -

500 µl 2xSSC/0,01%Triton X-100 für 10 min bei 30°C und 550 rpm

500 µl 2xSSC für 10 min bei 20°C und 550rpm

500 µl 0,2xSSC für 10 min bei 20°C und 550rpm

5

Der ArrayTube®-Chip wird mit 100 µl Meerettich-Streptavidin-Konjugat (1:100 Verdünnung) für 15 min (30°C, 550 rpm) inkubiert und anschließend gewaschen:

500 µl 2 x SSC/0,01%Triton X-100 für 10 min bei 30°C und 550 rpm

10

500 µl 2 x SSC für 10 min bei 20°C und 550 rpm

500 µl 0,2 x SSC für 10 min bei 20°C und 550 rpm

15 Zur Detektion werden 100 µl eines Tetramethylbenzidin-Derivats (Medac, Wedel, Deutschland) auf den Chip gegeben und das Ergebnis mit Hilfe eines AT-Readers (Clondia) und des Programms IconoClust (Clondia) ausgewertet. Die Ergebnisse für diverse Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* sind in den Abbildungen 1 bis 15 dargestellt.

d) Lösungen

20

10x SSPE- Puffer	1,5 M NaCl
	0,1 M Natriumphosphat
	0,01M EDTA
	pH 7,4

25

20x SSC- Puffer	3,0 M NaCl
	0,3 M Natriumcitrat

- 60 -

pH 7,0

Abbildungen

Die Abbildungen 1 bis 15 zeigen hybridisierte DNA-Chips, die mit unterschiedlichen
5 *P. aeruginosa*-Stämmen hybridisiert wurden. Die Aufarbeitung der Stämme erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Abbildung 16 zeigt ein Laborreaktionsgefäß typischer Form und Größe.

10 Abbildung 17 zeigt die Nukleotidsequenzen der im Ausführungsbeispiel eingesetzten Primer.

Erfindungsgemäße Oligonukleotid-Sonden sowie die Anordnung der Oligonukleotid-Sonden auf dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurechip sind in den Abbildungen 18
15 bis 21 gezeigt.

- 61 -

Ansprüche

1. Oligonukleotid zur Geno- und Pathotypisierung der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der
- 5 Gruppe bestehend aus (sämtliche Sequenzen in 5' → 3'-Richtung):

i)

GAAGCCCAGCAATTGCGTGTTTC
GAAGCCCAGCAACTGCGTGTTTC
GGTGCTGCAGGGTGTTTCGCCGG
GGTGCTGCAGGGCGTTTCGCCGG
CAAGATCGCCGCAGCGGTCAAC
CAAGATCGCCGCTGCGGTCAAC
TGCTGCTGGCGGCGGTGTGCTAT
TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCTAT
CCTCGCCCTGTTCCCGCCGCTCTGG
CTCGCCCTGTTCCCGCCGCTCTGG
TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG
CGAGCAACTGGCGGAGAAATCCG
GCGGAAAACCTCCTGCACATGATGTT
GCGGAAAACCTCCTCCACATGATGTT
AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG
AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
AAGAGGACGGCCGCCGGGTGACGCC
AAGAGGACGGCCGCCAGGTGACGCCG
GACAAGATGCGCCTCGACGACC
GACAAGATGCGTCTCGACGACCG
AGCCGACCTACGCGCCGGGCAG

- 62 -

CAGCCGACCTATGCGCCGGGCAG
CCGTTCGAACGGCTCATGGAGCA
GCCGTTCGAACGACTCATGGAGCA
TGGAGCAGCAAGTGTTCCCGGC
TGGAGCAGCAACTGTTCCCGGC
GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG
AACAAGACCGGCTCCACCAACGG
GCGACCTGGGCCTGGTGATCCT
GCGACCTGGGACTGGTGATCCT
GCCGACCAACTGAACTCCAACCTCG
GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA
CAGCCTGCGGTCATGTCCTCGG
CGCCAGTTTGAGAACGGAGTCACC
GCGCGATCTTCTCCACTTCATCGG
GCCTCCGCGATTGAACATCGTGAT
GTAGCCGGAGTCGAGCGGAATCAT
GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT
CGAGGAGTTTCGGACCCGCTTTGA
AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT
GCGCCTTCTCCTCTTTGCAGATGT
CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC
GCATCATTGCGCGTCACATCTGGT
TCTGAACTGCGGCTATCACCTGGA
AATTGATGGCTTCTCAGGCGCAGG
AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT
TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG
TGGTAGCTCTCGACGTACTGGCTG
CCCGTTGCTCATAACCCGTTTCCTG

- 63 -

AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG
ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT
AGCGTCCCTGACCAACCTCATCAG
CGCCAACAATTCGCCATTACAGCG
TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG
CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC
AGCCCAGCAATTGCGTGTTTCTCCG
AGCCCAGCAACTGCGTGTTTCTCC
GCTGCTGGCGGCGGTGTGC
TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT
CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG
GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
ACGGCCGCCGGGTGACGCC
ACGGCCGCCAGGTGACGCCG
GCCGACCTACGCGCCGGGC
AGCCGACCTATGCGCCGGGCA
GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA
GTTCGAACGACTCATGGAGCAGCAAG
CAGCCCAGTCAGGACGCGCA
AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC
GTGTCACGGCCCATGTCTAGCAGC
CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC
CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG
CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG
CCTGGACCTCTCCAAGGTTTCGCCT
GCCATTCCGACGACCAAACAAGGC
GTGCTGCAGGGTGTTTCGCCG
GCTGCAGGGCGTTTCGCCG

- 64 -

CAAGATCGCCGCAGCGGTCAACGAC
CAAGATCGCCGCTGCGGTCAACGAC
GCTCAGCAGACTGCTGACGAGGCTAACG
GCTCAGCAGACCGCTGACGAGGCTAAC
CGACCTACGCGCCGGGCAG
CGACCTATGCGCCGGGCAGC
CGTTCGAACGGCTCATGGAGCAG
CGTTCGAACGACTCATGGAGCAGC
CGACCTGGGCCTGGTGATCCT
GCGACCTGGGACTGGTGATCCTGG
CAGTTGTCGCCAGGTCTGGAGAATCC
CACATCAATGTCAGCCACGCCA
CTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTC
ACGAGGGTGATGGCTGGGAATACG
GCCAATTGGGTCAGCAAGCAACG
CGTGTCGCGAACTCGCATGGC
AGGCCATGGGCTAGCCGGATGC
CGAAGCGTAGGGTCTTCGTAGCC
TGCGAGGACCAGAAACCTTGATGG
CGGTATGAAGATGGGTGGTTGGGTCG
CCTGAATCCGACCATTCGCGAGTC
TCGGACTGTACTCCTACGAAGCAGC
CCAATCCCTATCGCTGGAACCGTACC
GCTCGGGACTCGCATTTTCGTCC
GCGTTATTGCTCGGTCTCTCCTCG
TGCATAGGAGTCATGCCGACAGCA
GCCTGCCTACTTGTTCCCAACGC
GGCTGTATTGCCCGCCATTCTCC

- 65 -

CGACAGACAGAAAGGGTTCTTGCGC
CACCATGCAAATGCTCGATGGACTGC
GCAGGCGTCCAAGTTGGAGCTCTCC
GGAACACAACGTGGGGCGTGAC
CCAGTTGGCACCACCATGCTTGC
GACCGCAAGCAGAAACGGCATGC
CCATGGTCGGAACAGGCACGATATGC
CCACTCGATCATGTTGAGCATCGGCTCC
GGTTAGTCCCTTCTGCCCCGCATCG

ii) Oligonukleotiden, die mit einem der Oligonukleotide unter i) in mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80 % und besonders bevorzugt mindestens 90 %, 92 %, 94 %, 96 % der Basen übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas*

5 *aeruginosa* ermöglichen,

iii) Oligonukleotiden, die sich von einem der Oligonukleotide unter i) und ii) dadurch unterscheiden, dass sie um mindestens ein Nukleotid verlängert sind, und

iv) Oligonukleotiden, die mit einer Sequenz, die zu einem Oligonukleotid unter i), ii) und iii) komplementär ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

10

2. Microarray-Vorrichtung, umfassend ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

15

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung ein Reaktionsgefäß ist, welches eine für ein Laborreaktionsgefäß (Tube) typische Form und/oder typische Größe aufweist, und bei dem auf einer seiner Grundflächen ein Trägerelement mit darauf auf

- 66 -

vorbestimmten Bereichen immobilisierten Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* angeordnet ist.

- 5 4. Vorrichtung nach Anspruch 2 oder 3,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden derart ausgewählt sind,
dass sie jeweils von 30% bis 70% der Population von Stämmen von *Pseudomonas*
aeruginosa erfassen.
- 10 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für
Nukleinsäuren, die eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz des
Referenzstamms von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen.
- 15 6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für
Nukleinsäuren, die in nur einem oder wenigen Stämmen der Spezies *Pseudomonas*
aeruginosa vorkommen.
- 20 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für
Nukleinsäuren, die in Pathogenitätsinseln im Genom von *Pseudomonas aeruginosa*
vorliegen.
- 25 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für
Nukleinsäuren, die in krankheitsassoziierten Genen wie *exoS* und *exoU* vorliegen.

- 67 -

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für
Nukleinsäuren, die in für Flagellen von *Pseudomonas aeruginosa* kodierenden
Genen enthalten sind.
- 5
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden ausgewählt werden aus den
Oligonukleotiden nach Anspruch 1.
- 10
11. Verfahren zum spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der
Spezies *Pseudomonas aeruginosa* in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:
a) Inkontaktbringen der Probe mit einem Nukleinsäure-Chip in einer Microarray-
Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 10; und
b) Detektion der Wechselwirkung zwischen den Oligonukleotid-Sonden und in der
15 Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass die in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren vor
der Detektion amplifiziert werden.
- 20
13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels Multiplex-PCR erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
25 dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation Primer eingesetzt werden, die
ähnliche Schmelzpunkte und/oder ähnliche Bindungskinetiken aufweisen.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14,

dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation linear erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass die Primer ausgewählt werden mit einer
- 5 Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus (sämtliche
Sequenzen in 5' → 3'-Richtung):
- ACGCGGATGTCCTGGATTTGG
CTGAAGAAGGGGCGCTACGCG
GCGTACCGGGCAAGGTGATAG
- 10 CTCGGTGAAACATCGGGAGGG
TCATCCAGCAAGCCATTGCGC
GGAGTCGCTTTCCGCCATCG
TGGAGTCGCTTTCCGCCATCG
AAGGGCGTTTCACGCTGACGC
- 15 ATCCGGAAGGGCGTTTCACG
TCCACACCTCAGACTTCGGCG
TATTGACGACCTACCGCGCGC
GCAACTGATGTTGCGCCAGC
CGCAACTGATGTTGCGCCAGC
- 20 ACACGCAACTGATGTTGCGCC
TGTCCCGGCTCAGTTCAACG
AACACCTTGGCGTTTGTCCC
GCAACACCTTGGCGTTTGTCC
TCAAGCTCGTTGTGGACCGC
- 25 GTTACGACGGCGTGCTGTCGG
ACGCAACGTATTCGGCGACCC
CGCAACGTATTCGGCGACCC
AGCTGATGGTATCGCCGTCGC

- 69 -

CTAGTGATCGCACCGGAGCC
AGCCTCGACACCGGTTCTCG
TCGTTTCATCCCCAGGCTTCG
ACCATCTCGTTTCATCCCCAGG
5 TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG
TCGACGCGACGGTTCGAGCC
TGACGTTCTCGCCGGTAGCG
CAGTAGCGGTACCGGTCTGCG
CAGTAGCGGTACCGGTCTGC
10 TTCCTCGCCGGCATAGTAGGC
CGAGGACGAGGCATCTTCCGG
GCAGGTAGCAGGTTTCCAGG
AACTGTTCTTCTGCGCGGCG
TGATCGGCTTGGTCTCGCAGG
15 GCTGATCGGCTTGGTCTCGC
GAGGCGTTCTGCTCGTGGTCG
TTTTTCCAGCATGCGCAGGG
GCTGGCTTTTTCCAGCATGCG
TTGCGGCTGGCTTTTTCCAGC
20 TTGGGATAGTTGCGGTTGGC
CGTAGGCGATCTTCACCCGC
TGGCGTAGGCGATCTTCACCC
GGCGAGATAGCCGAACAGGC
GCGGCGAGATAGCCGAACAGG
25 CACTTGCTGCTCCATGAGCC
GAGGTCGAGCAGGCTGATGC
TAGGTCGCGAGGTCGAGCAGG
GTCCTTCTGCACCGAGTCGG

- 70 -

CGCATCTTGTCTGGGTCAGG
TCGTCGAGGCGCATCTTGTCC
ACGTCGAGGTGGGTCTGTTCG
GTAGCCTTCGGCATCCAGCG
5 TCGGCATTGGGATAGTTGCGG
CCTCCTGTCTCATGCCGATGC
GCATTCGCCACGGAAGGAAGG
GAAGGCATCATGGCATTGCC
GTCATGGGGTTTCCCAGAGACC
10 GATCGCGATGTCGACGGTGCC
CGATCGCGATGTCGACGGTGC
TGCCGATCGCGATGTCGACG
GACGAATACCCAGCTGCGTGG
GCAGACGAATACCCAGCTGCG
15 CGCGACGTCGTGACGTCAGC
ACTTTCGGCTCTTCGGGGCTGG
AGGTAGAGACTCGGGGGAACC
TCGTTTTTCGGTCATGGCCAGG
TTCCGCGACGAACATCCGTGG
20 CGCTTCCGCGACGAACATCCG
GGATCGCTTCCGATAGGGCAGC
AGAGGCATGGGTCTGTACCG
TCTGTCAATCCCCTTTGGGG
AGCCCCTTTCTGTCAATCCCC
25 GGCTTCCTACCGAAGGTCAGG
TGAGGGCTTCCTACCGAAGG
TTCAAGGTCATGGGCAATGCC
AGTCCCTTCAAGGTCATGGGC

- 71 -

GCCGACTGAGCTGTAGCTCGG
GGCCGACTGAGCTGTAGCTCG
ACCAGACTGGTCAATGGTGG
CCCGTGTTTCCGTAGACCTTGC
5 AGCAGTTACCCACAGCATGG
CAGCAGTTACCCACAGCATGG
CTACACTCCAACCGCTGGTCC
GACCTACACTCCAACCGCTGG
TTCCCTTGCTGCCGAGAAGC
10 TAATAGGCGAGCCTGCCGTCC
TCCACGCCGAGGGACGTGCC
GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC
CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC
CCAATGCCCAGGGCCAGCGGA
15 CGCTGGCAGTTCCGCTGGCC
CAGGGTCGCCAGCTCGCTCGCC
AGGGTCGCCAGCTCGCTCGC
AGTGATCTGCCGCGGCCCTGCC
GTGATCTGCCGCGGCCCTGC
20 GTTCCACAGGCGCTGCGGCGC
GTTCCACAGGCGCTGCGGCG
CAAAGCCCCTGGTCGCGCGG
GCAGCTTTTCCACCGCCGGCGG
AAACTGCCCCGCCCCCATCC
25 GGAAAACTGCCCCGCCCCC
ACGCTCGCAGCGCCTCACGCG
GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC
GGGGTCGAGACGTGTACATGG

- 72 -

TTCTGGGCCAGAGTTGGACC
AGCTTAAGGCCGTGGCACTCG
CCGGAGAATTCGCGTCCACC
TGCTGACGATGAAGCCCCAGC
5 AGGAGGCCGATGACAACACCC
TGCCGATTCCATGCTCACGCC
ACGACGTCACCGTCGAGACCG
ACCGCCTTTCTGGTGAGCTGG
AGCCAAGACGGTTGTTCGCGG
10 TCAATGACGCCGAGTTGGCGC
CTCGGACAGGTTACGCTGG
GCCATTCGCTGCAACACCTCC
GCGCGCGTTCGAGAAACAGG
CGGAGGTTGAAAAGCTGGCCC
15 ATGCCATCGTTGAAGGCACCGC
TGCCATCGTTGAAGGCACCG
TCTGGCGGAATCAGGTAGGCC
CTTCCGGGGAGAAACCACCG
ACCTCCAGCACCGACACACC
20 ATCCGATCCACCTCCAGCACC
CGTTCAGGTCGTAGACCGCGC
GCGATACCAACTGTCCTGCGGC
TGCCGAAGGTGAATGGCTTGCC
CCTGATGGTCCGATCCCAGC
25 GCCGAGGGTCAAGAACCACTGG
TCTTGGCCCAGTCATAGCGGC
TAACCCCAAGGCCCATTTGGAGG
GCCACCGCCTTCGAATAACCCC

- 73 -

AATTGCTCGAGGGATGCGGC
GGTCGAAACGGATGCGCAGG
GCCCCGCGTCATTTTCACGTCG
AATGCTCTGGGCAACGAGCC
5 CTACCCAGCTTGGGCGTAGC
AAGCGATAGCCGTGCTCCTGC
CCGGCTATATCCGCGGCTACC
ATTGGCGCTGCTGTTTACGCCC
GGTGGCGTCGGGTTTTTCTGC
10 AGGTCGTAGCGGAAGGTGGTGG
ATCTGAACCGAGGGGATCCGC
CCCGGGAGTCATTGGTCTGG
GCCTGTTGGACCCCTTTGACC
TACTCCTGCCTGTTGGACCCC
15 CGCTCAAGCGCTATCCCACC
CGCCATCGGCCTGTACAACG
CGGTAGAGAGCTGGGTTGGC
AACCTGGAGCTAGGGCAGAGC
GGTGCTCGACCCAAGCATCG
20 TCCTTGAGTTCCTTGGCGCGG
CAACACGCGACTGGCGATCC
TACATCATCCGCAACGGCGGC
TATTGACGACCTACCGCGCGCC
CACCAAGAACCCGCTGCTCG
25 ATCGTGGCAGGATGTCCACCG
TAGGCGGGCCTTTTGAAGGTGC

- 74 -

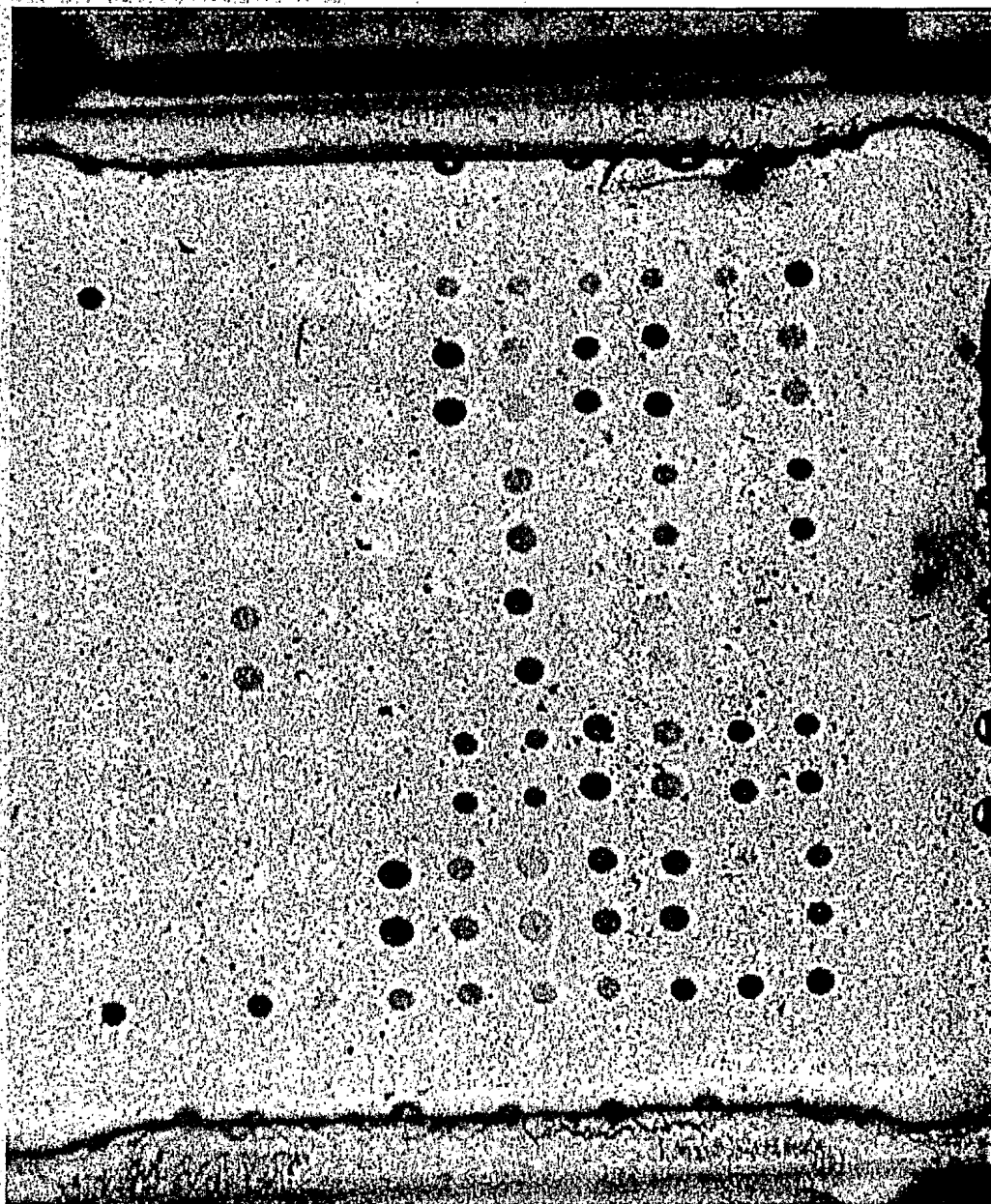
17. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

5 18. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 bzw. der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 10 bzw. des Verfahrens nach einem der Ansprüche 11 bis 16 zur Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

10 19. Verwendung der Primer gemäß Anspruch 16 zur Amplifikation von Nukleinsäuren von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

ABB.1

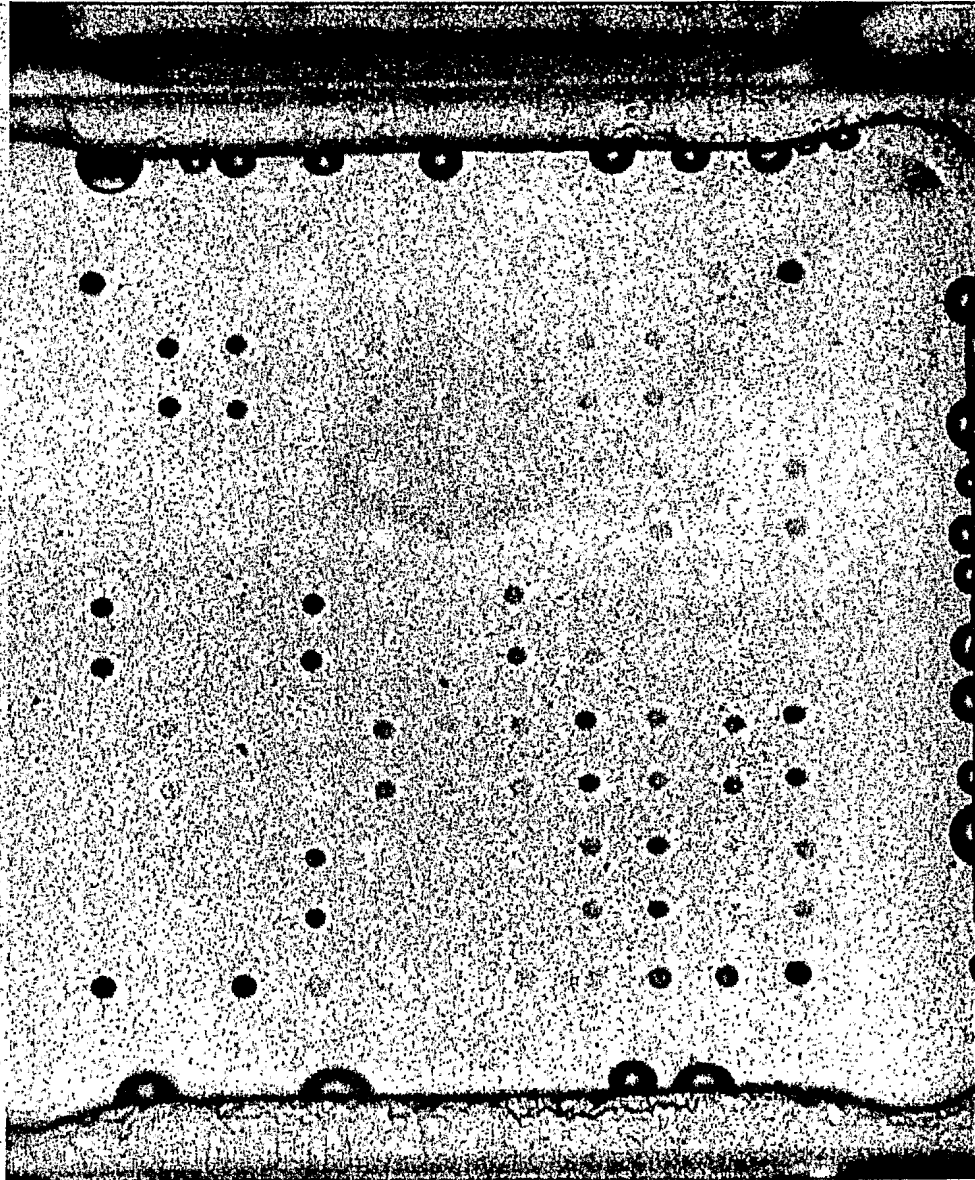
P. aeruginosa AT-Chip



ZW117

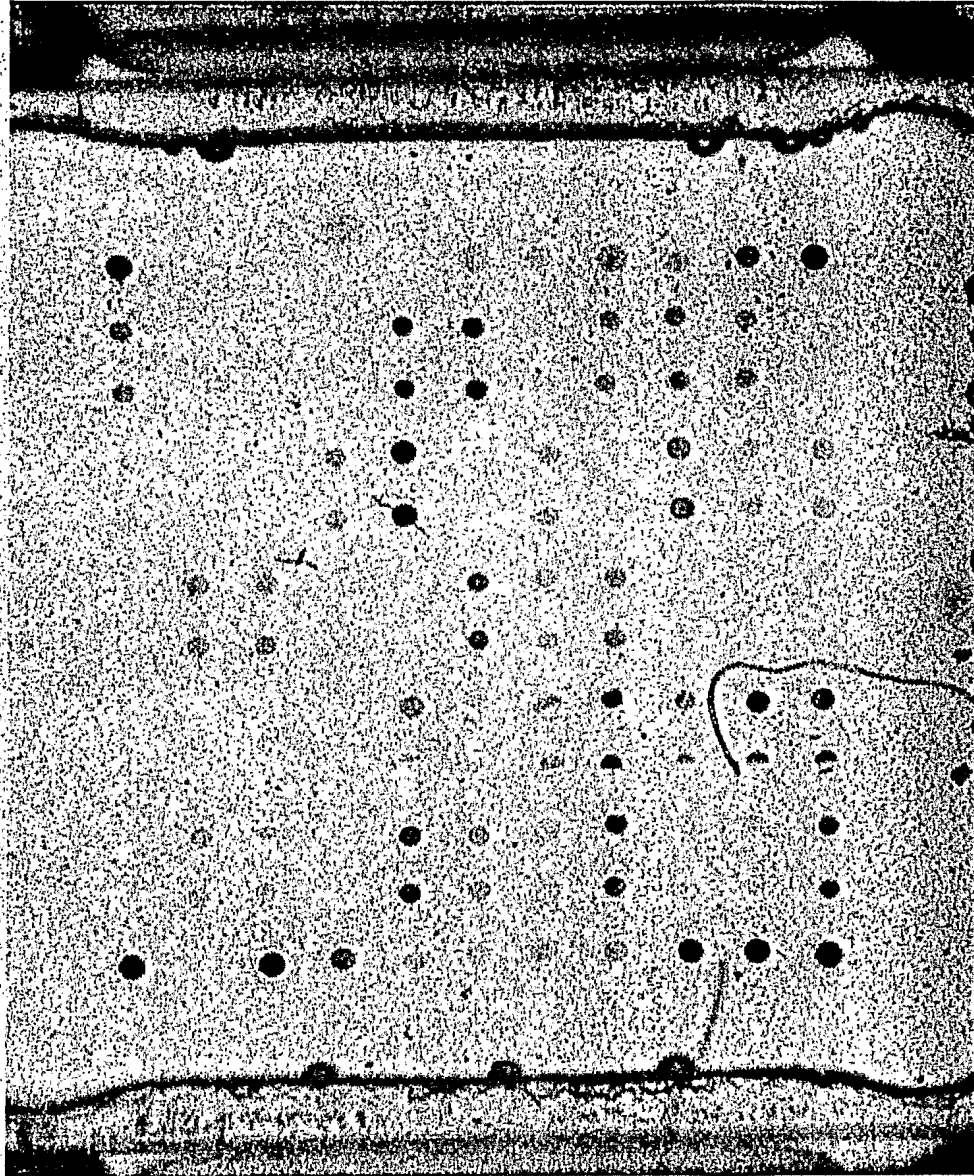
Abb.2

P. aeruginosa AT-Chip



RP17

P. aeruginosa AT-Chip



TB

P. aeruginosa AT-Chip

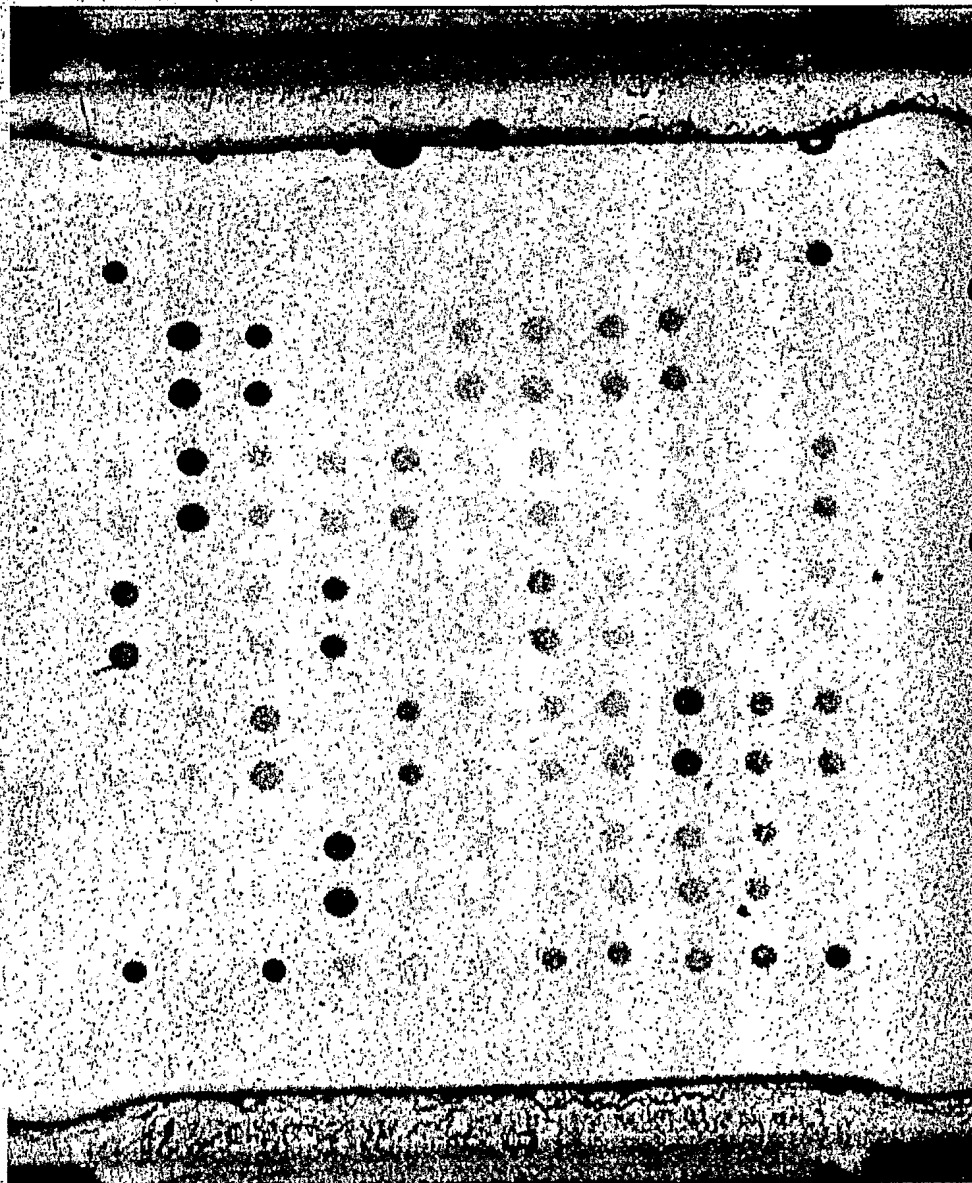
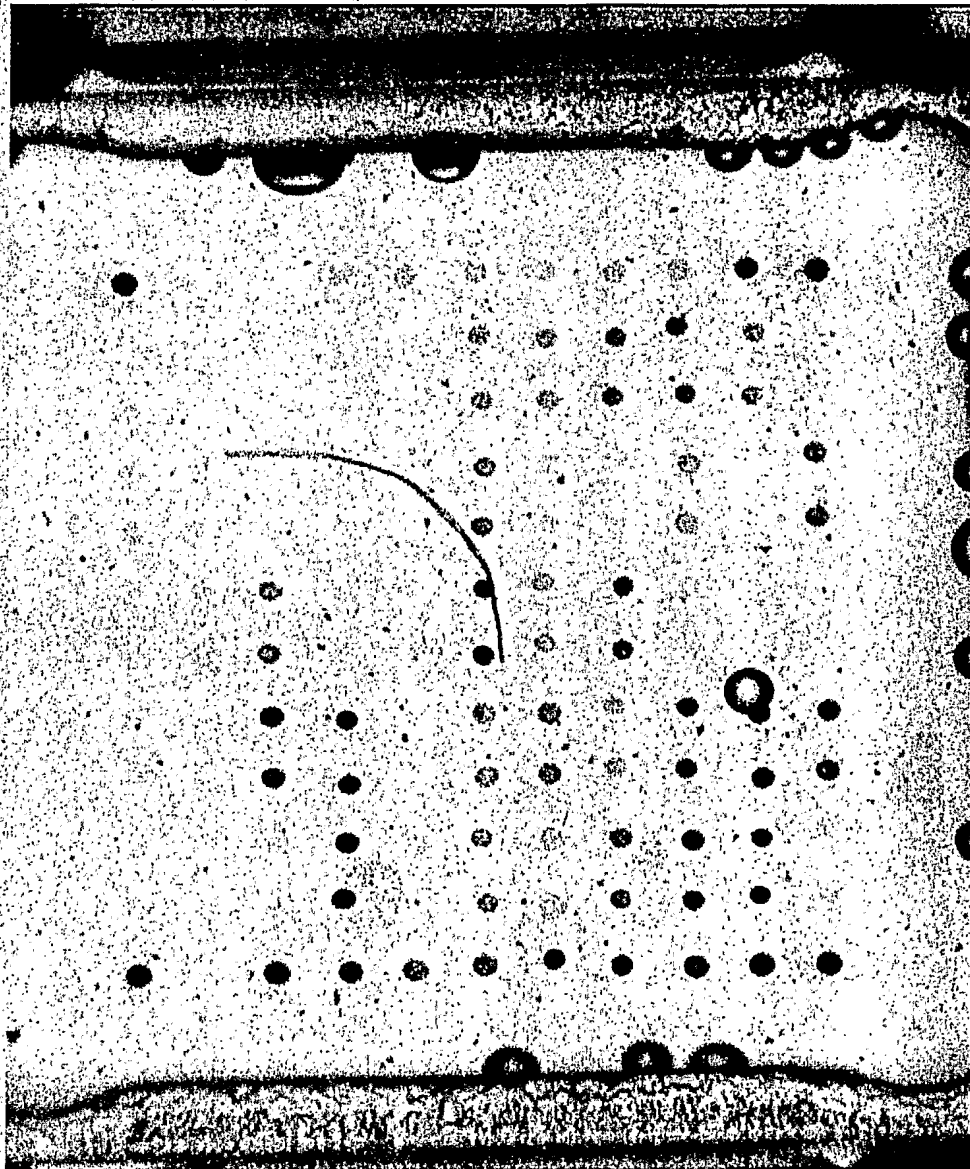


Abb.4

SG17M

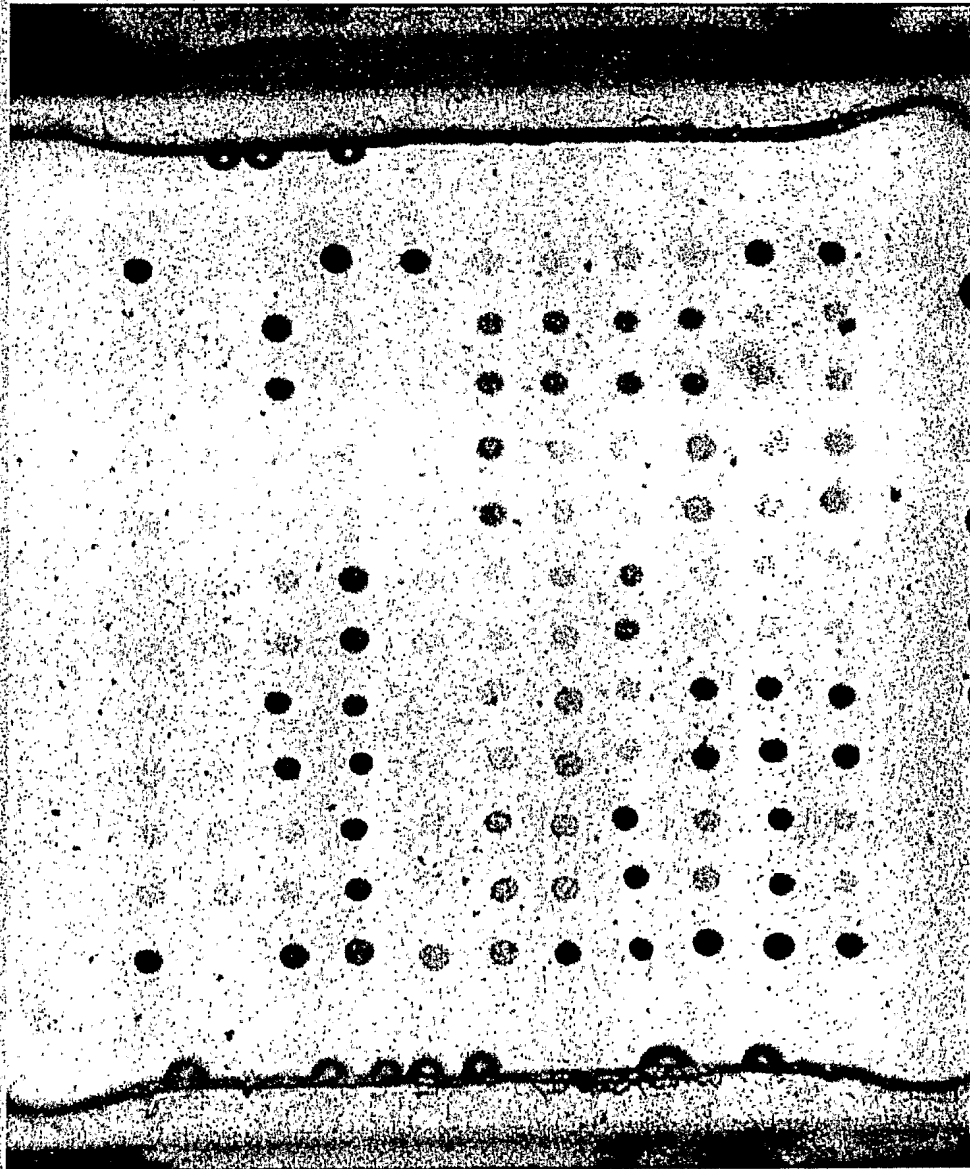
Abb.5

P. aeruginosa AT-Chip



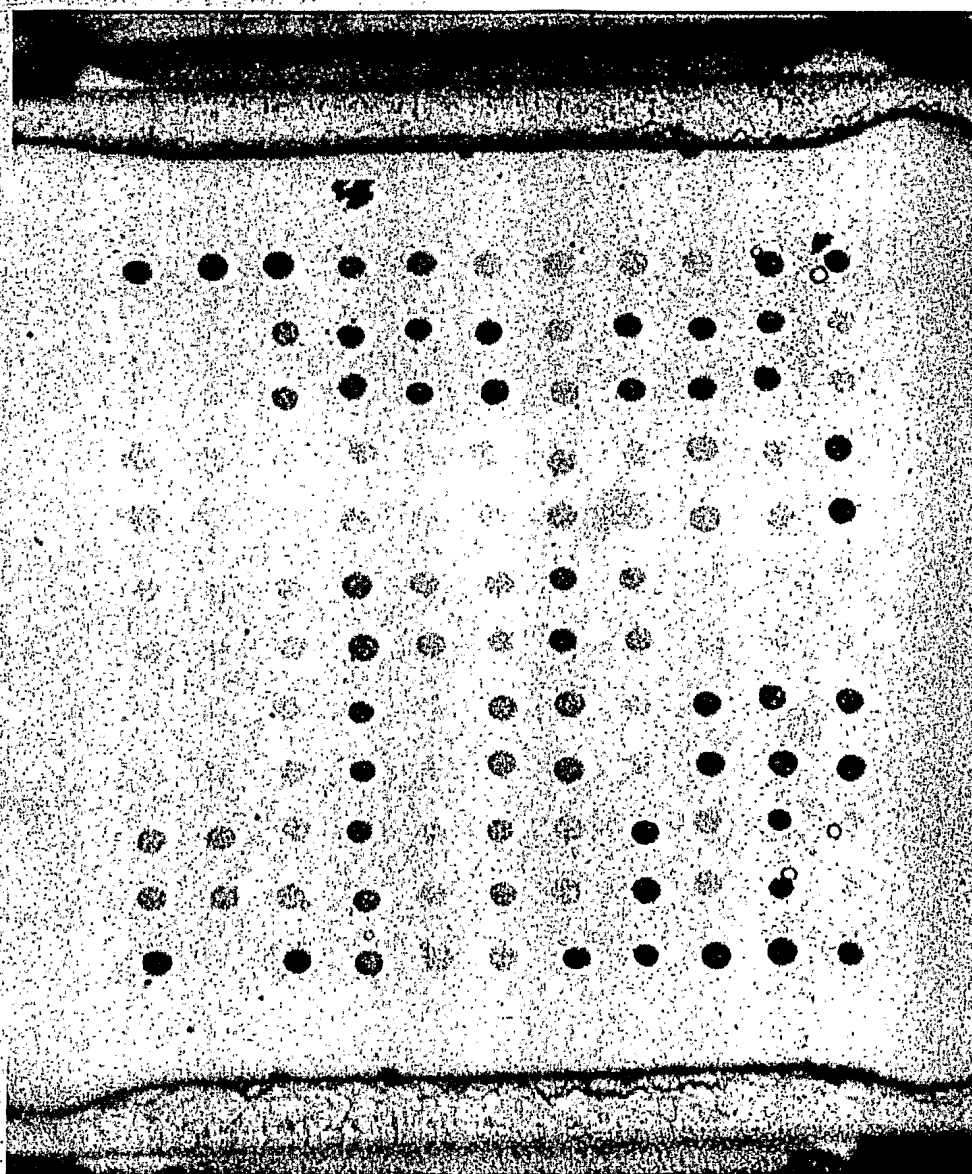
BS185

P. aeruginosa AT-Chip



AL5846

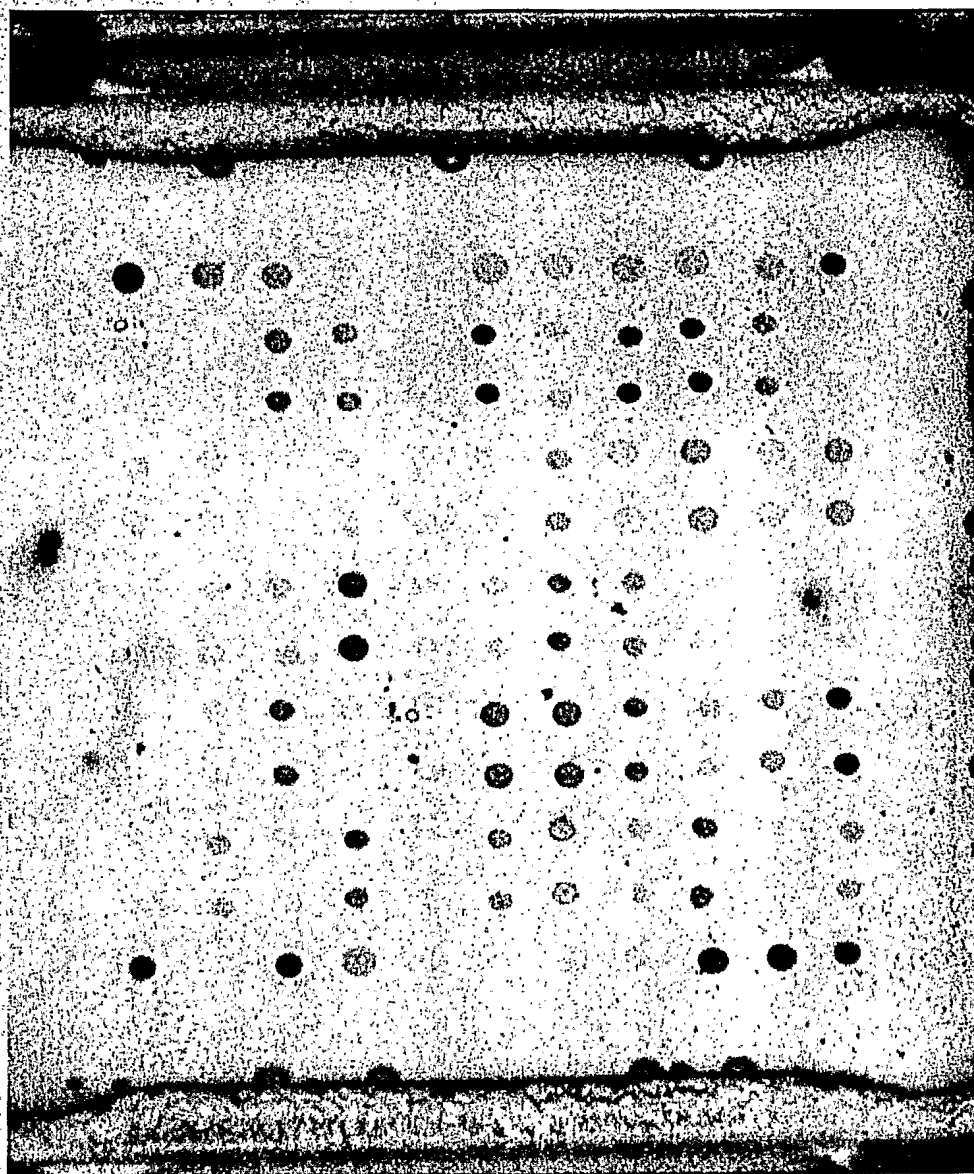
P. aeruginosa AT-Chip



PT12

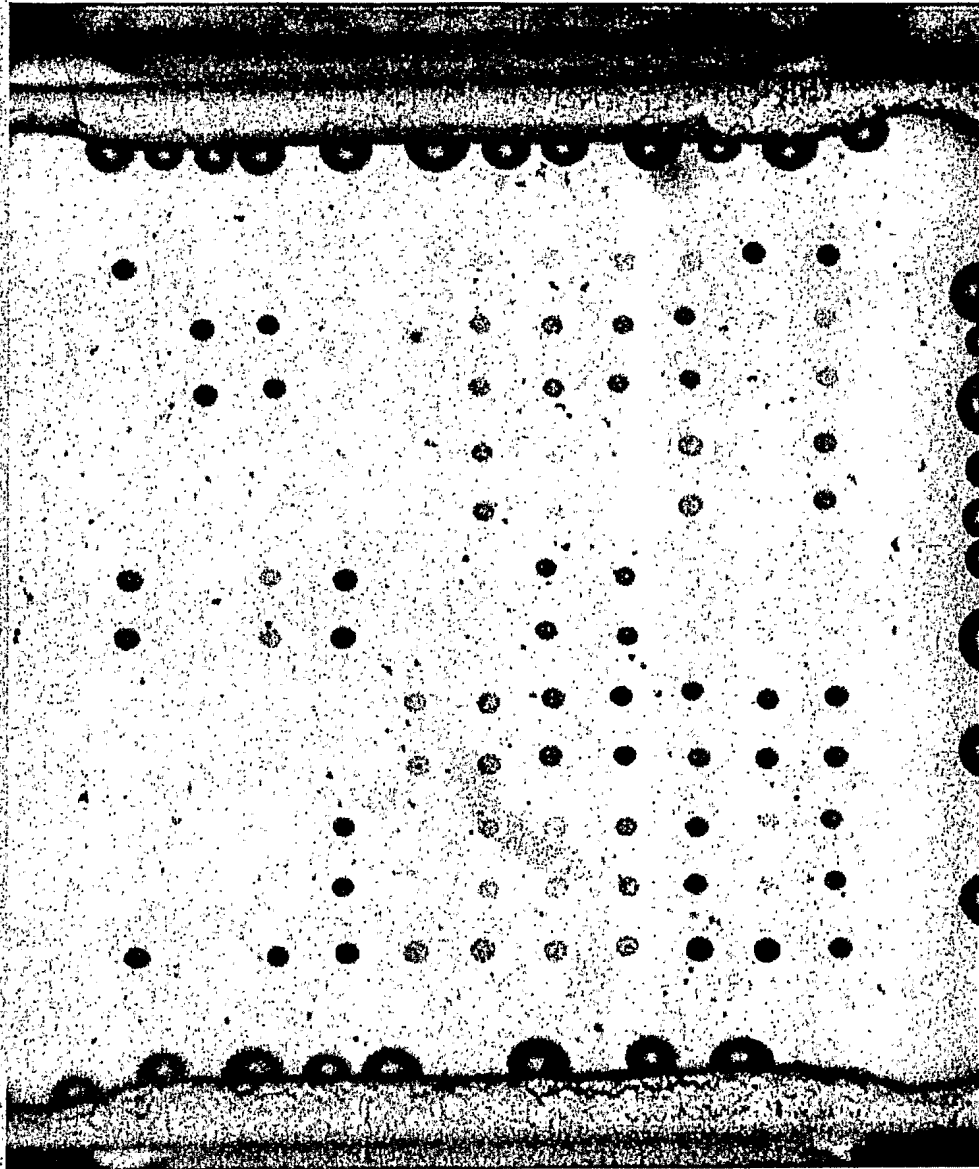
Abb.8

P. aeruginosa AT-Chip



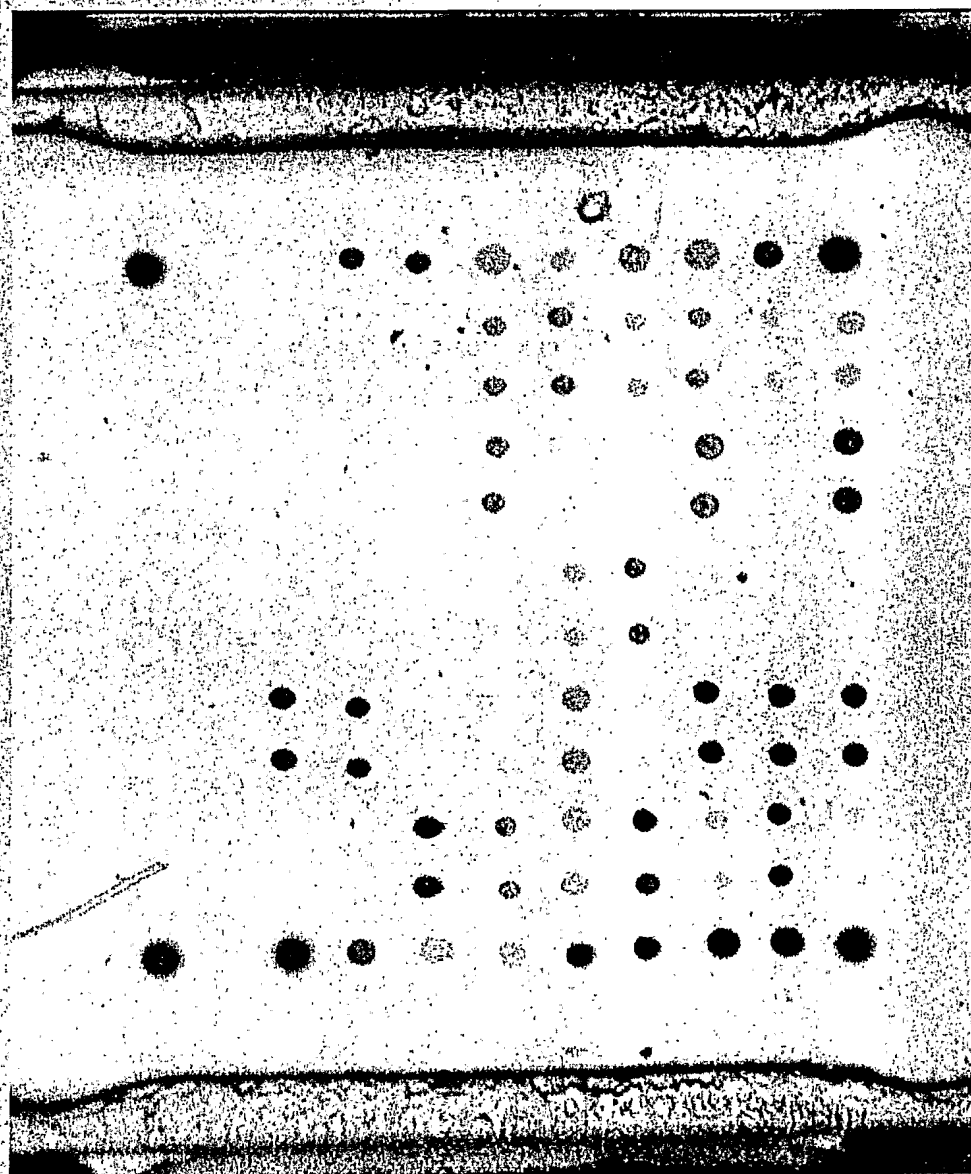
PT20

P. aeruginosa AT-Chip



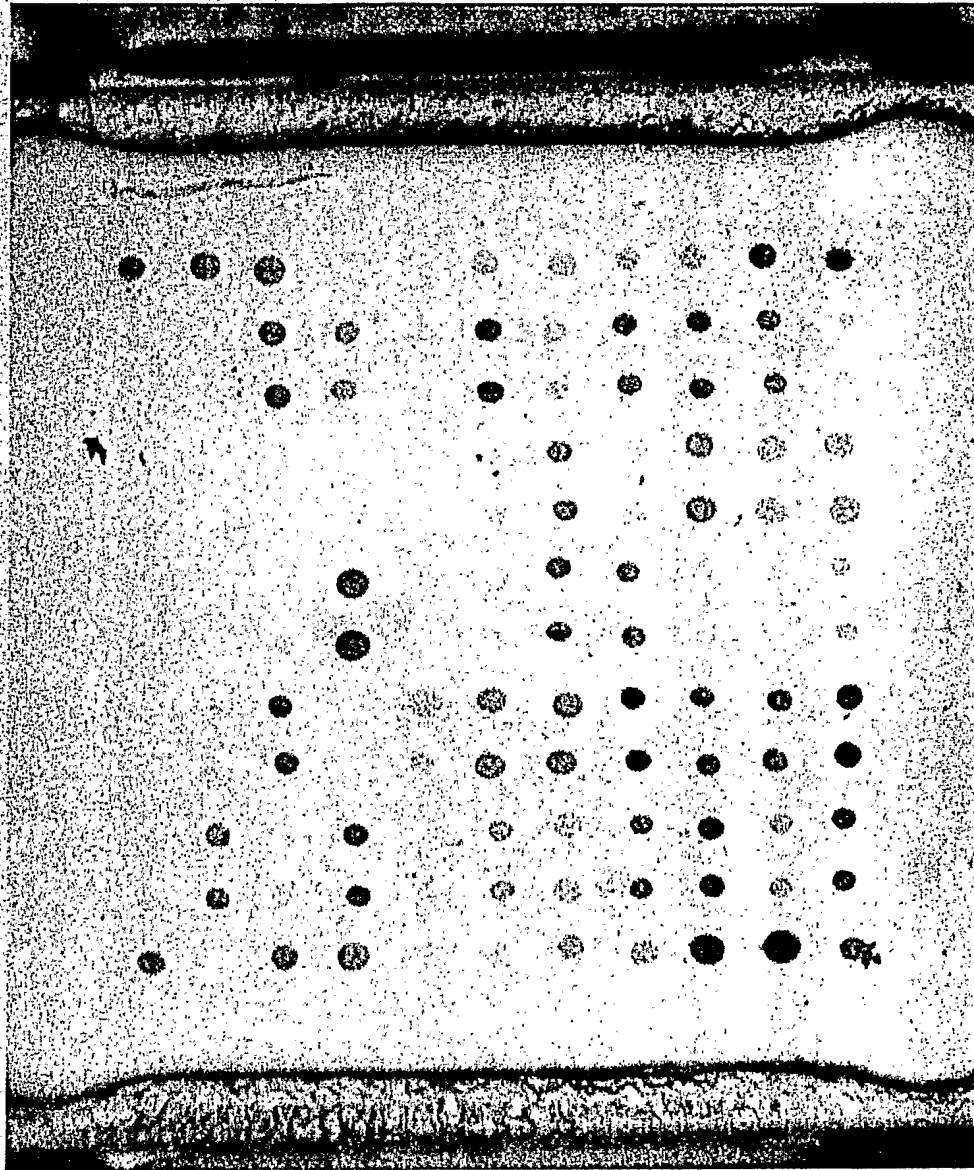
ZW79

P. aeruginosa AT-Chip



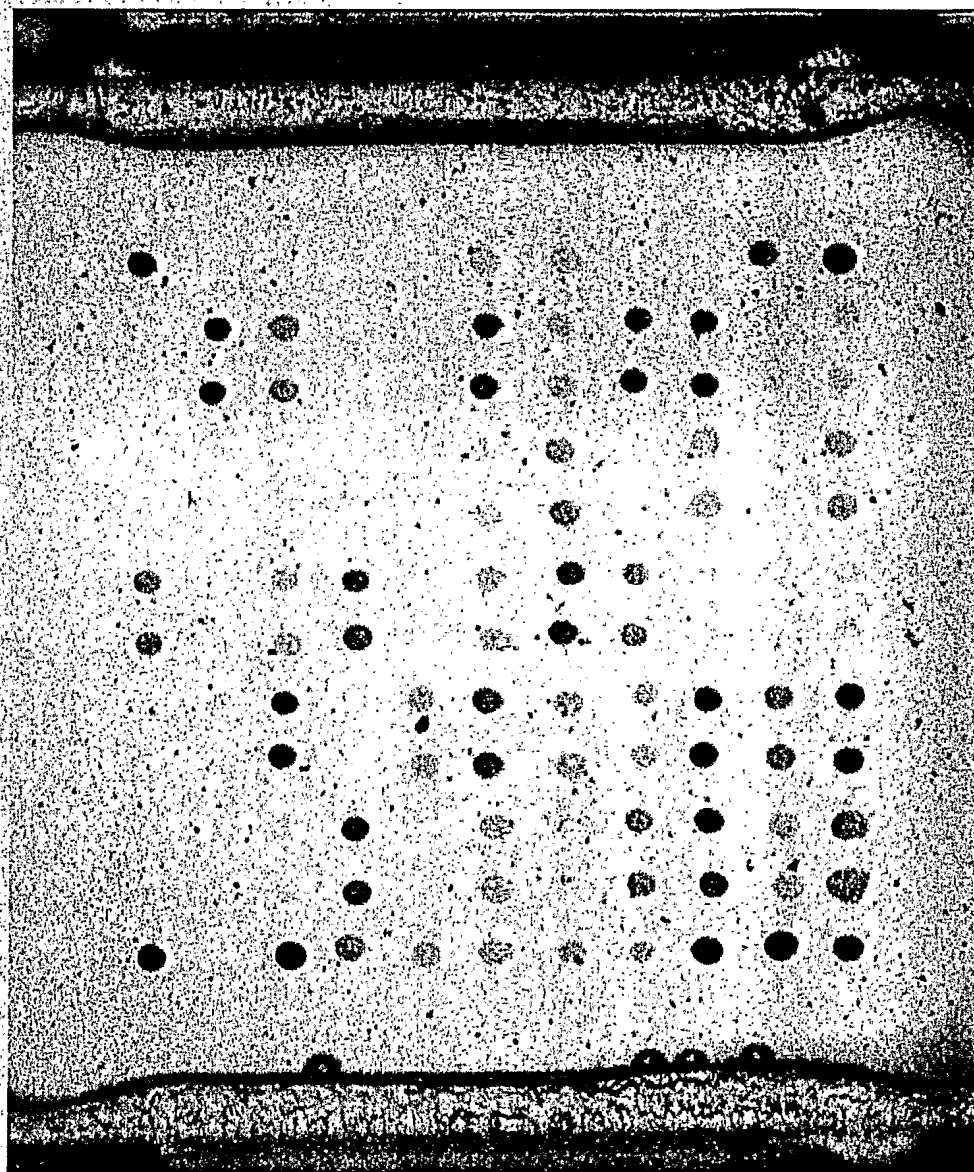
ZW85

P. aeruginosa AT-Chip



2813A

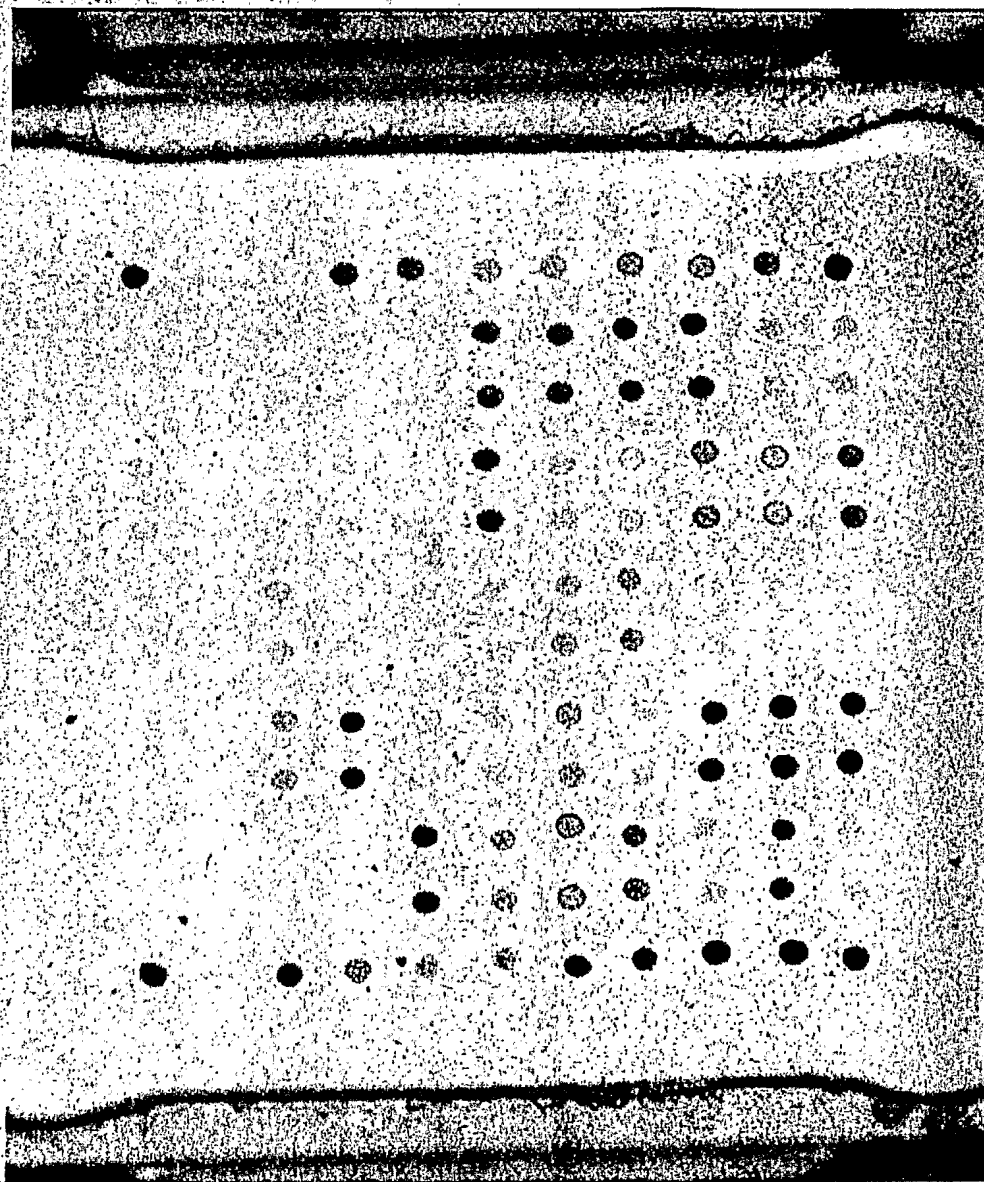
P. aeruginosa AT-Chip



KB1-85

Abb.13

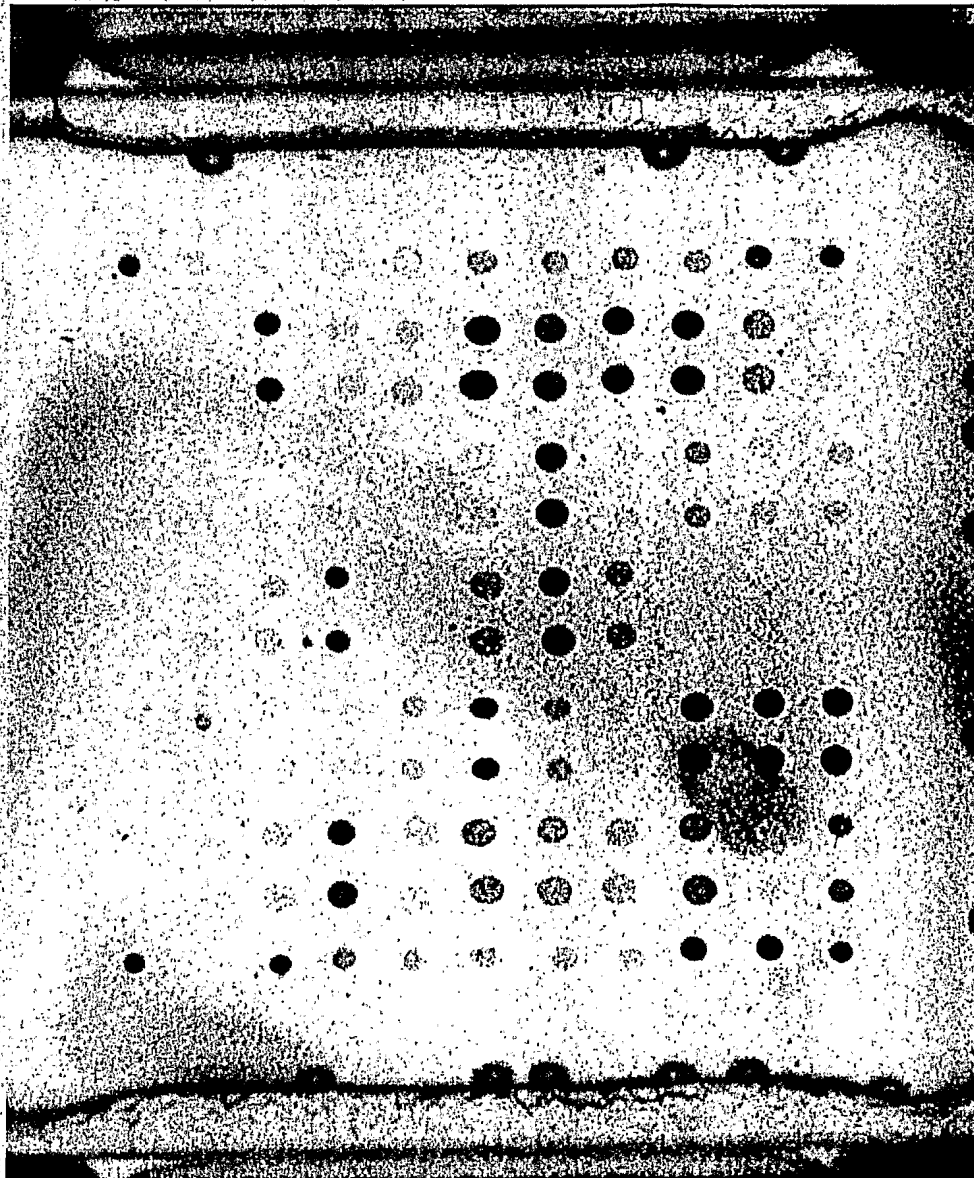
P. aeruginosa AT-Chip



ZW98

Abb.14

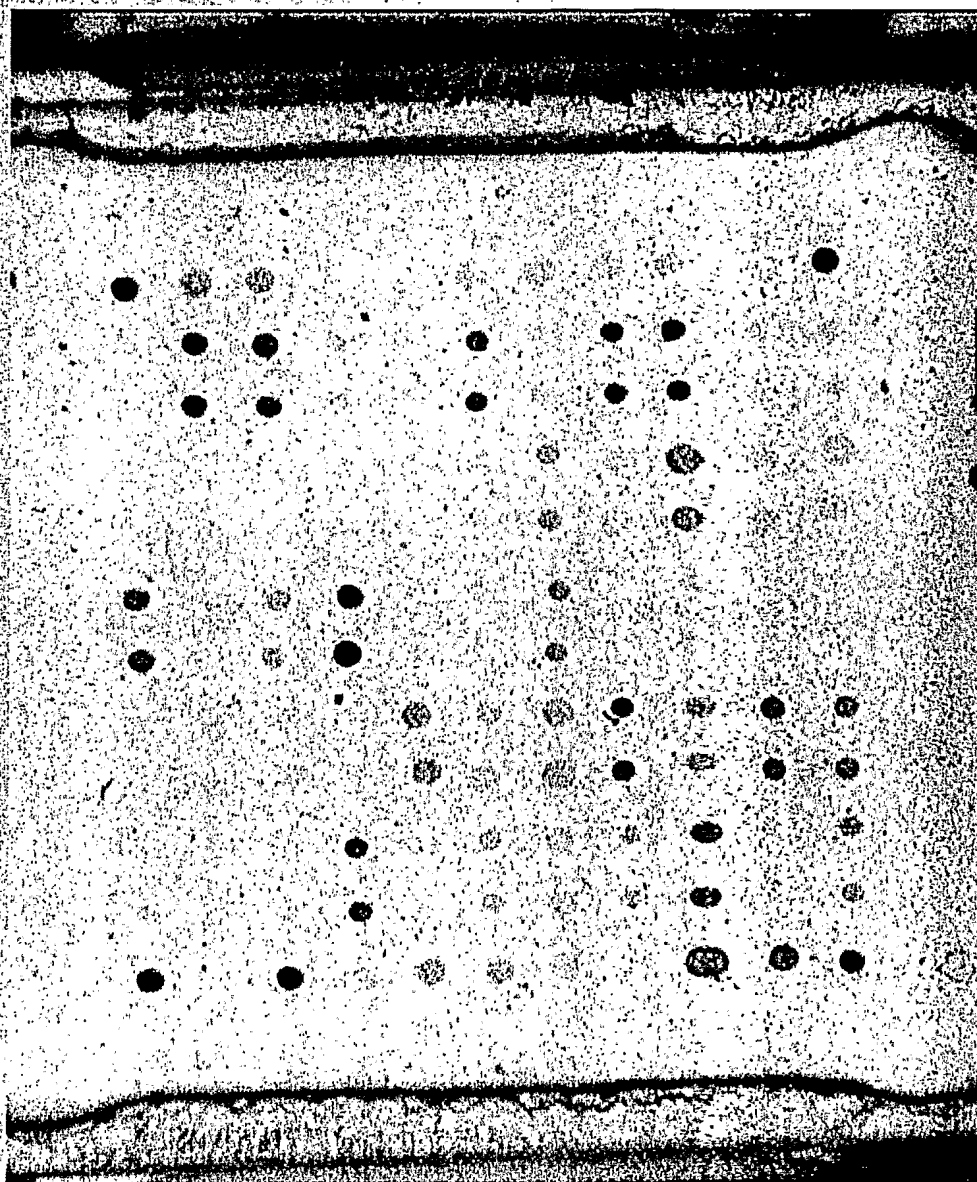
P. aeruginosa AT-Chip



641HD

Abb.15

P. aeruginosa AT-Chip



ATCC15522

Abb.16

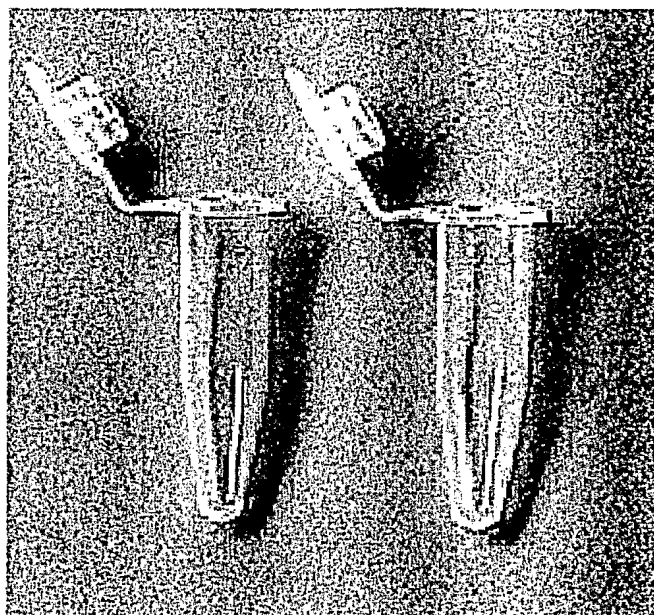


Abb.17a

47-1/23
ACGCGGATGTCCTGGATTTGG

47-1/39
CTGAAGAAGGGGCGCTACGCG

47-2/22
GCGTACCGGGCAAGGTGATAG

47-2/52
CTCGGTGAAACATCGGGAGGG

C45/18
TCATCCAGCAAGCCATTGCGC

C45/60a
GGAGTCGCTTTCCGCCATCG

C45/60b
TGGAGTCGCTTTCCGCCATCG

C46/15
AAGGGCGTTTCACGCTGACGC

C46/22
ATCCGGAAGGGCGTTTCACG

C46/88
TCCACACCTCAGACTTCGGCG

C47-1/43
TATTGACGACCTACCGCGCGC

C47-2/56a
GCAACTGATGTTGCCCCAGC

C47-2/56b
CGCAACTGATGTTGCCCCAGC

C47-2/59
ACACGCAACTGATGTTGCCCC

CIS-4/36
TGTCCCGGCTCAGTTCAACG

CIS-4/50
AACACCTTGCGCTTTGTCCC

CIS-4/51
GCAACACCTTGCGCTTTGTCC

CIS-5/4
TCAAGCTCGTTGTGGACCGC

CIS-5/48
GTTACGACGGCGTGCTGTCGG

CSP-1/39a
ACGCAACGTATTCGGCGACCC

CSP-1/39b
CGCAACGTATTCGGCGACCC

Abb.17b

fliAT/28
AGCTGATGGTATCGCCGTCGC

fliAT/72
CTAGTGATCGCACCGGAGCC

oriC/20
AGCCTCGACACCGGTTCTCG

oriC/54
TCGTTTCATCCCCAGGCTTCG

oriC/59
ACCATCTCGTTTCATCCCCAGG

oprL/53
TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG

oprL/65
TCGACGCGACGGTTCTGAGCC

fliCb/36
TGACGTTCTCGCCGGTAGCG

fliCb/65
CAGTAGCGGTACCGGTCTGCG

fliCb/66
CAGTAGCGGTACCGGTCTGC

alkAG/27
TTCCTCGCCGGCATAGTAGGC

alkGA/32

alkGA/51
CGAGGACGAGGCATCTTCCGG

citAG/4
GCAGGTAGCAGGTTTCCAGG

citAG/46
AACTGTTTCCTTCTGCGCGGCG

citGC/8
TGATCGGCTTGGTCTCGCAGG

citGC/11
GCTGATCGGCTTGGTCTCGC

citGC/75
GAGGCGTTCTGCTCGTGGTCG

oprI/12
TTTTTCCAGCATGCGCAGGG

oprI/17
GCTGGCTTTTTCCAGCATGCG

oprI/22
TTGCGGCTGGCTTTTTCCAGC

Abb.17c

am7CA/1
TTGGGATAGTTGCGGTTGGC

am7CA/27
CGTAGGCGATCTTCACCCGC

am7CA/29
TGGCGTAGGCGATCTTCACCC

am3CT/21
GGCGAGATAGCCGAACAGGC

am3CT/22
GCGGCGAGATAGCCGAACAGG

am3CT/69
CACTTGCTGCTCCATGAGCC

am2CT/35
GAGGTCGAGCAGGCTGATGC

am2CT/42
TAGGTCGCGAGGTCGAGCAGG

am2CT/92
GTCCTTCTGCACCGAGTCGG

am1GA/49
CGCATCTTGTCCTGGGTCAGG

am1GA/58
TCGTCGAGGCGCATCTTGTC

am45/1
ACGTCGAGGTGGGTCTGTTCG

am45/96
GTAGCCTTCGGCATCCAGCG

am6TC/60
TCGGCATTGGGATAGTTGCGG

GI11/15
CCTCCTGTCTCATGCCGATGC

GI11/59
GCATTGCCACGGAAGGAAGG

GI11/71
GAAGGCATCATGGCATTGCGC

GI18/62
GTCATGGGGTTTCCCAGAGACC

fliCa/41
GATCGCGATGTCGACGGTGCC

fliCa/42
CGATCGCGATGTCGACGGTGC

fliCa/46
TGCCGATCGCGATGTCGACG

Abb.17d

SG-1/40
GACGAATACCCAGCTGCGTGG

SG-1/43
GCAGACGAATACCCAGCTGCG

SG-4/1
CGCGACGTCGTGACGTCAGC

SG-4/67
ACTTTCGGCTCTTCGGGCTGG

TB46/21
AGGTAGAGACTCGGGGAACC

TB46/45
TCGTTTTTCGGTCATGGCCAGG

TB471/22
TTCCGCGACGAACATCCGTGG

TB471/25
CGCTTCCGCGACGAACATCCG

TB472/36
GGATCGCTTCCGATAGGGCAGC

TB472/84
AGAGGCATGGGTCTGTACCG

TB473/34
TCTGTCAATCCCCTTTGGGG

TB473/41
AGCCCCTTTCTGTCAATCCCC

TB474/36
GGCTTCCTACCGAAGGTCAGG

TB474/41
TGAGGGCTTCCTACCGAAGG

exoS/31
TTCAAGGTCATGGGCAATGCC

exoS/37
AGTCCCTTCAAGGTCATGGGC

exoU/22
GCCGACTGAGCTGTAGCTCGG

exoU/23
GGCCGACTGAGCTGTAGCTCG

exoU/42
ACCAGACTGGTCAATGGTGG

flins/2
CCCGTGTTTCCGTAGACCTTGC

pKL11/49a
AGCAGTTACCCACAGCATGG

Abb.17e

pKL11/49b
CAGCAGTTACCCACAGCATGG

pKL3/47
CTACACTCCAACCGCTGGTCC

pKL3/50
GACCTACACTCCAACCGCTGG

pKL3/80
TTCCCTTGCTGCCGAGAAGC

pKL7/14
TAATAGGCGAGCCTGCCGTCC

47D7nw1a
TCCACGCCGAGGGACGTGCC

47D7nw1b
GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC

C46-nw1a
CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC

C46-nw1b
CCAATGCCCAGGGCCAGCGGA

C46-nw1c
CGCTGGCAGTTCGCTGGCC

ExoSnw1a
CAGGGTCGCCAGCTCGCTCGCC

ExoSnw1b
AGGGTCGCCAGCTCGCTCGC

ExoUnw1a
AGTGATCTGCCGCGGCCCTGCC

ExoUnw1b
GTGATCTGCCGCGGCCCTGC

OrfA-1
GTTCCACAGGCGCTGCGGCGC

OrfA-2
GTTCCACAGGCGCTGCGGCG

OrfA-3
CAAAGCCCCTGGTCGCGCGG

OrfC-1
GCAGCTTTTCCACCGCCGGCGG

OrfI-1
AAACTGCCCCGCCCCCATCC

OrfI-2
GGAAAACTGCCCCGCCCCC

OrfJ-1
ACGCTCGCAGCGCCTCACGCG

OrfJ-2
GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC

Abb.17f

Abb.18a

no	tube	name	5'-3'-sequence	group	length	GC-content [%]	Tm [°C]	spot-ID's
1	Pa-S_001	oriC_T-C_wt	GAAGCCAGCAATTGCGTGTTC	1	23	52,2	62,4	2,3
2	Pa-S_056	oriC_T-C_mut_1	GAAGCCAGCAACTGCGTGTTC	1	23	56,5	64,2	14,15
3	Pa-S_057	oprL_T-C_wt_1	GGTGTGCAGGGTGTTCGCCGG	1	23	69,6	69,6	4,5
4	Pa-S_058	oprL_T-C_mut_1	GGTGTGCAGGGCGTTTCGCCGG	1	23	73,9	71,3	16,17
5	Pa-S_059	flfC a A-T_wt_1	CAAGATCGCCCGAGCGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	6,7
6	Pa-S_060	flfC a A-T_mut_1	CAAGATCGCCGCTGCGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	18,19
7	Pa-S_061	alkB2 G-A_wt_1	TGCTGTGGCGGGCGGTGTGCTAT	1	23	65,2	67,8	8,9
8	Pa-S_062	alkB2 G-A_mut_1	TGCTGTGGCAGCGGTGTGCTAT	1	23	60,9	66,0	20,21
9	Pa-S_063	alkB2 A-G_wt_1	CCTCGCCCTGTTCCTCCACCCGCTCTGG	1	25	72,0	72,8	10,11
10	Pa-S_064	alkB2 A-G_mut_1	CTCGCCCTGTTCCTCCCGCGCTCTGG	1	24	75,0	73,0	22,23
11	Pa-S_065	citS A-G_wt_1	TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG	1	24	54,2	64,4	26,27
12	Pa-S_066	citS A-G_mut_1	CGAGCAACTGGCGGAGAAATCCG	1	23	60,9	66,0	38,39
13	Pa-S_067	citS G-C_wt_1	GCGGAAAACCTTCCTGCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	28,29
14	Pa-S_068	citS G-C_mut_1	GCGGAAAACCTTCCTCCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	40,41
15	Pa-S_069	oprL_T-C_wt_1	AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG	1	23	60,9	66,0	30,31
16	Pa-S_070	oprL_T-C_mut_1	AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG	1	22	63,6	65,8	42,43
17	Pa-S_071	ampC_1 G-A_wt_1 ampC_1 G-	AAGAGGACGGCCCGCGGCTGACGCC	1	25	76,0	74,5	32,33
18	Pa-S_072	A_mut_1	AAGAGGACGGCCCGCCAGGTGACGCCG	1	26	73,1	74,3	44,45
19	Pa-S_019	ampC_2 C-T_wt ampC_2 C-	GACAAAGATGGCGCCTCGACGACC	1	22	63,6	65,8	34,35
20	Pa-S_073	T_mut_1	GACAAAGATGGCTCTCGACGACCCG	1	23	60,9	66,0	46,47
21	Pa-S_021	ampC_3 C-T_wt ampC_3 C-	AGCCGACCTACGCGCCCGGCGAG	1	22	77,3	71,4	50,51
22	Pa-S_074	T_mut_1	CAGCCGACCTATGCGCCCGGCGAG	1	23	73,9	71,3	62,63
23	Pa-S_075	ampC_4 G-A_wt_1 ampC_4 G-	CCGTTTGAACCGGCTCATGGAGCA	1	23	60,9	66,0	52,53
24	Pa-S_076	A_mut_1	GCCGTTTGAACCGACTCATGGAGCA	1	24	58,3	66,1	64,65
25	Pa-S_077	ampC_5 G-C_wt_1	TGGAGCAGCAAGTGTTCCTCCGGC	1	22	63,6	65,8	54,55

Abb.18b

26	Pa-S_078	ampC_5 G-	TGGAGCAGCAACTGTTCCCGGC	1	22	63,6	65,8	66,67
27	Pa-S_027	C_mut_1	GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG	1	24	58,3	66,1	56,57
28	Pa-S_079	ampC_6 T-	AACAAGACCGGCTCCACCAACGG	1	23	60,9	66,0	68,69
29	Pa-S_029	C_mut_1	GGGACCTGGGCTGGTGATCCT	1	22	68,2	67,7	58,59
30	Pa-S_080	ampC_7 C-	GGGACCTGGGACTGGTGATCCT	1	22	63,6	65,8	70,71
31	Pa-S_031	A_mut_1	GCCGACCAACTGAACCTCAACTCG	2	24	58,3	66,1	74,75
32	Pa-S_032	fliC b	GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA	2	23	56,5	64,2	86,87
33	Pa-S_033	fliC a	CAGCCTGCGGTCAATGCTCTCGG	3	22	68,2	67,7	76,77
34	Pa-S_034	exoS-1	CGCCAGTTTGAGAACGGAGTCACC	3	24	58,3	66,1	88,89
35	Pa-S_038	exoU	GGCGGATCTTCTCCACTTCATCGG	4	24	54,2	64,4	78,79
36	Pa-S_039	C-47-1	GCCTCCGCGATTGAACATCGTGAT	4	24	58,3	66,1	90,91
37	Pa-S_040	C-47-2	GTAGCCGGAGTCGAGCGGAATCAT	5	24	54,2	64,4	80,81
38	Pa-S_041	47D7-1	GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT	5	24	58,3	66,1	92,93
39	Pa-S_054	47D7-2	CGAGGAGTTTCGGACCGCGCTTGA	6	24	54,2	64,4	82,83
40	Pa-S_055	C-45	AATAGGACCGGCAGAACGGGCANT	6	24	58,3	66,1	94,95
41	Pa-S_035	C-46	GCGCCTTCTCCTCTTTCAGATGT	7	24	54,2	64,4	98,99
42	Pa-S_036	C-Inselspez.-4	CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC	7	24	58,3	66,1	110,111
43	Pa-S_037	C-Inselspez.-5	GCATGATGCGCGTGCATCTGCT	8	24	58,3	66,1	122,123
44	Pa-S_044	C-spezifisch-1	TCTGAACCTGGGCTATCACCTGGA	9	24	54,2	64,4	100,101
45	Pa-S_045	pKL-3	AATTGATGGCTTCTCAGGCGCAGG	9	24	54,2	64,4	112,113
46	Pa-S_046	pKL-7	AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT	9	25	52,0	64,6	124,125
47	Pa-S_042	pKL-11	TTCTCGGTGTCGAGGATTCCTGG	10	24	58,3	66,1	102,103
48	Pa-S_043	PAGI-1-1	TGGTAGCTCTCGACGTACTGGCTG	10	24	58,3	66,1	114,115
49	Pa-S_047	PAGI-1-8	CCCGTTGCTCATACCCGTTCCCTG	11	24	58,3	66,1	104,105
50	Pa-S_048	SG17M-4	AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG	11	24	54,2	64,4	116,117
51	Pa-S_053	SG17M-1	ACCTGTGCTCGGTGGAGGGTATGTT	12	24	58,3	66,1	106,107
52	Pa-S_049	fla-insel-1	AGCGTCCCTGACCAAGCTCATCAG	13	24	58,3	66,1	118,119
53	Pa-S_050	TB-C47-1	CGCCAACAATTCCGCCATTACAGCG	13	24	54,2	64,4	126,127
54	Pa-S_051	TB-C47-2	TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG	13	24	58,3	66,1	128,129

55	Pa-S_052	TB-C47-4	CGCTGCACATACAGGTCGGTTCTC	13	24	54,2	64,4	130,131	Abb.18c
56	Biotin + Cy3-marker							1,12,97,121,132	
57	Pa-S_081	oriC T-C_wt_1	AGCCCAGCAATTGCGTGTTCCTCCG	1	25	65,6	56		
58	Pa-S_082	oriC T-C_mut_2	AGCCCAGCAACTGCGTGTTCCTCC	1	24	65,1	58		
59	Pa-S_083	alkB2 G-A_wt_2	GCTGCTGGCGCGGTGTGC		19	67,4	79	8,9	
60	Pa-S_084	alkB2 G-A_mut_2	TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT		21	67,3	67	20,21	
61	Pa-S_085	oprI T-C_wt_2	CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG		27	64,6	56		
62	Pa-S_086	oprI T-C_mut_2	GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG		25	64,9	60		
63	Pa-S_087	ampC_1 G-A_wt_2	ACGGCCGCCGGGTGACGCC		19	70,2	84		
		ampC_1 G-							
64	Pa-S_088	A_mut_2	ACGGCCGCCAGGTGACGCCG		20	69,9	80		
65	Pa-S_089	ampC_3 C-T_wt_1	GCCGACCTACGCCCGGGC		19	68,4	84		
		ampC_3 C-							
66	Pa-S_090	T_mut_2	AGCCGACCTATGCGCCGGGCA		21	68,4	71		
67	Pa-S_091	ampC_4 G-A_wt_2	GTTCGAAACGGCTCATGGAGCAGCA		24	65	58		
		ampC_4 G-							
68	Pa-S_092	A_mut_2	GTTCGAAACGACTCATGGAGCAGCAAG		26	63,5	54		
69	Pa-S_093	exoS-1_1	CAGCCCAGTCAGGACGGCA		20	64,9	70		
70	Pa-S_094	exoU_1	AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC		24	64,8	58		
71	Pa-S_095	47D7-1_1	GTGTCACGGCCCCATGTCTAGCAGC		24	65	63		
72	Pa-S_096	C-46_1	CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC		23	64,5	65		
73	Pa-S_097	Fla-Insel-2_orfA	CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG		24	64,8	63		
74	Pa-S_098	Fla-Insel-2_orfC	CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG		24	64,3	63		
75	Pa-S_099	Fla-Insel-2_orfI	CCTGGACCTCTCCAAGGTTCCGCT		24	65	63		
76	Pa-S_100	Fla-Insel-2_orfJ	GCCATTCCGACGACCAACAAAGGC		24	64,2	58		

group "mother"

well- no	tube	name	5'-3'-sequence	GC-				spot- ID's
				group	length	content [%]	Tm [°C]	
1	Pa-S_001	oriC T-C_wt	GAAGCCAGCAATGCGTGTTTC	1	23	52,2	62,4	23
2	Pa-S_056	oriC T-C_mut_1	GAAGCCAGCAACTGCGTGTTTC	1	23	56,5	64,2	14,15
57	Pa-S_081	oriC T-C_wt_1	AGCCAGCAATGCGTGTTTCTCCG	1	25	65,6	56	13,25
58	Pa-S_082	oriC T-C_mut_2	AGCCAGCAACTGCGTGTTTCTCC	1	24	65,1	58	37,49
3	Pa-S_057	oprL T-C_wt_1	GGTGCTGCAGGGTGTTTCGCCGG	1	23	69,6	69,6	4,5
4	Pa-S_058	oprL T-C_mut_1	GGTGCTGCAGGGGTTTCGCCGG	1	23	73,9	71,3	16,17
5	Pa-S_059	fliC a A-T_wt_1	CAAGATCGCCGCGAGCGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	6,7
6	Pa-S_060	fliC a A-T_mut_1	CAAGATCGCCGCGTGCGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	18,19
59	Pa-S_083	alkB2 G-A_wt_2	GCTGCTGGCGGGCGGTGTGC	1	19	67,4	79	8,9
60	Pa-S_084	alkB2 G-A_mut_2	TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT	1	21	67,3	67	20,21
9	Pa-S_063	alkB2 A-G_wt_1	CCTCGCCCTGTTCCTCCACCGCTCTGG	1	25	72,0	72,8	10,11
10	Pa-S_064	alkB2 A-G_mut_1	CTCGCCCTGTTCCTCCCGCGCTCTGG	1	24	75,0	73,0	22,23
11	Pa-S_065	citS A-G_wt_1	TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG	1	24	54,2	64,4	26,27
12	Pa-S_066	citS A-G_mut_1	CGAGCAACTGGCGGAGAAATCCG	1	23	60,9	66,0	38,39
13	Pa-S_067	citS G-C_wt_1	GCGGAAAACCTTCCTGCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	28,29
14	Pa-S_068	citS G-C_mut_1	GCGGAAAACCTTCCTCCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	40,41
15	Pa-S_069	oprI T-C_wt_1	AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG	1	23	60,9	66,0	30,31
16	Pa-S_070	oprI T-C_mut_1	AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG	1	22	63,6	65,8	42,43
61	Pa-S_085	oprI T-C_wt_2	CAGAAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG	1	27	64,6	56	61,73
62	Pa-S_086	oprI T-C_mut_2	GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG	1	25	64,9	60	24,85
63	Pa-S_087	ampC_1 G-A_wt_2 ampC_1 G-	ACGGCCGCGGGTGACGCC	1	19	70,2	84	32,33
64	Pa-S_088	A_mut_2	ACGGCCGCGCAGGTGACGCCG	1	20	69,9	80	44,45
19	Pa-S_019	ampC_2 C-T_wt ampC_2 C-	GACAAGATGCGCCCTCGACGACC	1	22	63,6	65,8	34,35
20	Pa-S_073	T_mut_1	GACAAGATGCGTCTCGACGACCG	1	23	60,9	66,0	46,47
21	Pa-S_021	ampC_3 C-T_wt ampC_3 C-	AGCCGACCTACGCGCGGGCAG	1	22	77,3	71,4	50,51
22	Pa-S_074	T_mut_1	CAGCCGACCTATGCGCGGGCAG	1	23	73,9	71,3	62,63

Abb.19a

Abb.19b

65	Pa-S_089	ampC_3 C-T_wt_1 ampC_3 C-T_mut_2	1	19	68,4	84	36,48
66	Pa-S_090	AGCCGACCTATGCGCCGGGCA	1	21	68,4	71	60,72
67	Pa-S_091	GTTTGAACGGCTCATGGAGCAGCA	1	24	65	58	52,53
68	Pa-S_092	GTTTGAACGACTCATGGAGCAGCAAG	1	26	63,5	54	64,65
25	Pa-S_077	TGGAGCAGCAAGTGTTCCTCCGGC	1	22	63,6	65,8	54,55
26	Pa-S_078	TGGAGCAGCAACTGTTCCTCCGGC	1	22	63,6	65,8	66,67
27	Pa-S_027	GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG	1	24	58,3	66,1	56,57
28	Pa-S_079	AACAAGACCGGCTCCACCAACGG	1	23	60,9	66,0	68,69
29	Pa-S_029	GCGACCTGGGCCCTGGTGATCCT	1	22	68,2	67,7	58,59
30	Pa-S_080	GCGACCTGGGACTGGTGATCCT	1	22	63,6	65,8	70,71
31	Pa-S_031	GCGACCAACTGAATCCAACCTCG	2	24	58,3	66,1	74,75
32	Pa-S_032	GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA	2	23	56,5	64,2	86,87
69	Pa-S_093	CAGCCAGTCAGGACGGGCA	3	20	64,9	70	76,77
34	Pa-S_034	CGCCAGTTTGAGAACGGAGTCACC	3	24	58,3	66,1	88,89
70	Pa-S_094	AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC	3	24	64,8	58	84,96
35	Pa-S_038	GCGGGATCTTCTCCACTTCATCGG	4	24	54,2	64,4	78,79
71	Pa-S_095	GTGTACGGGCCCATGTCTAGCAGC	5	24	65	63	80,81
38	Pa-S_041	GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT	5	24	58,3	66,1	92,93
39	Pa-S_054	CGAGGAGTTTCGGACCGGCTTTGA	6	24	54,2	64,4	82,83
40	Pa-S_055	AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT	6	24	58,3	66,1	94,95
72	Pa-S_096	CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC	6	23	64,5	65	108,120
41	Pa-S_035	GCGCCTTCTCCTCTTTGCAGATGT	7	24	54,2	64,4	98,99
42	Pa-S_036	CAGTATGGTACGGACACGAACGGC	7	24	58,3	66,1	110,111
43	Pa-S_037	GCATCATTCGGGTACATCTGGT	8	24	58,3	66,1	122,123
44	Pa-S_044	TCTGAACCTGCGGCTATCACCTGGA	9	24	54,2	64,4	100,101
46	Pa-S_046	AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT	9	25	52,0	64,6	124,125
47	Pa-S_042	TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG	10	24	58,3	66,1	102,103
48	Pa-S_043	TGGTAGCTCTCGACGTAAGTGGCTG	10	24	58,3	66,1	114,115

Abb.19c

49	Pa-S_047	SG17M-1	CCCGTTGCTCATAAACCCGTTCCCTG	11	24	58,3	66,1	104,105
50	Pa-S_048	SG17M-4	AGGGCATTTCTCAGGTGGACTCAGG	11	24	54,2	64,4	116,117
51	Pa-S_053	fla-insel-1	ACCTGTGTCGGCTGGAGGGTATGTT	12	24	58,3	66,1	106,107
54	Pa-S_051	TB-C47-3	TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG	13	24	58,3	66,1	128,129
55	Pa-S_052	TB-C47-4	CGCTGCACATACAGGTCGGTTCTC	13	24	54,2	64,4	130,131
73	Pa-S_097	Fla-Insel-2_orfA	CGCTGGAGGGTATGTTCCGCCAAGG	14	24	64,8	63	90,91
74	Pa-S_098	Fla-Insel-2_orfC	CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG	14	24	64,3	63	112,113
75	Pa-S_099	Fla-Insel-2_orfI	CCTGGACCTCTCCAAGGTTCCGCCT	14	24	65	63	118,119
76	Pa-S_100	Fla-Insel-2_orfJ	GCCATTCCGACGACCAACAAGGC	14	24	64,2	58	126,127
56	Biotin + Cy3-marker							1,12,97,121,132
		group "mother"						

Abb.20**Chip: MHH_P_aer_array2 (12x11 array mit spot-Abstand von 0,19 mm)**

56	43	43	46	46	76	76	54	54	55	55	56
	42	42	74	74	48	48	50	50	75	75	72
56	41	41	44	44	47	47	49	49	51	51	72
62	32	32	34	34	73	73	38	38	40	40	70
61	31	31	69	69	35	35	71	71	39	39	70
61	22	22	68	68	26	26	28	28	30	30	66
58	21	21	67	67	25	25	27	27	29	29	66
58	12	12	14	14	16	16	64	64	20	20	65
57	11	11	13	13	15	15	63	63	19	19	65
57	2	2	4	4	6	6	60	60	10	10	62
56	1	1	3	3	5	5	59	59	9	9	56

Abb.21

Chipbelegung

Markerspot	C-spezifisch-1	pKL-11	Fla-Insel-2_orfJ	TB-C47-3	TB-C47-4	Markerspot
mut_2 oprI T-C wt_2 oprI T-C wt_2	C-Inselnspezifisch-5		Fla-Insel-2_orfC	SG17M-4	Fla-Insel-2_orfI	C-46_1
	C-Inselnspezifisch-4		pKL-3		fla-Insel-1	C-46_1
mut_2 oprI T-C wt_2 oprI T-C wt_2	flic A	exoU	Fla-Insel-2_orfA	47D7-2	C-46	exoU_1
	flic B	exoS-1_1	C-47-1	47D7-1_1	C-45	exoU_1
mut_2 oriC T-C mut_2 oriC T-C wt_1 oriC T-C wt_1	mut_1 ampC_3 C-T wt_1	mut_2 ampC_4 G-A wt_2	mut_1 ampC_5 G-C wt_1	mut_1 ampC_6 T-C wt_1	mut_1 ampC_7 C-A wt_1	mut_2 ampC_3 C-T mut_2 ampC_3 C-T wt_1 ampC_3 C-T wt_1
	mut_1 citS A-G wt_1	mut_1 citS G-C wt_1	mut_1 oprI T-C wt_1	mut_2 ampC_1 G-A wt_2	mut_1 ampC_2 C-T wt_1	
mut_2 oriC T-C wt_1	mut_1 oriC T-C wt_1	mut_1 oprL T-C wt_1	mut_1 fliC a A-T wt_1	mut_2 alkB2 G-A wt_2	mut_1 alkB2 A-G wt_1	oprI T-C mut_2
						Markerspot